

**Intrauterine Wachstumsretardierung:  
Gestörte Interaktion von Trophoblastzellen und  
endothelialen Tubuli bei veränderter  
Adhäsionsmolekülexpression**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

Universitätsklinikum Jena  
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Abteilung Placenta-Labor

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Anna Katharina Multhaup  
geboren am 14. März 1988 in Friedrichroda**

### **Gutachter**

- 1. PD Dr. med. habil. Tanja Groten**
- 2. Prof. Dr. med. Frauke von Versen-Höynck, Msc.**
- 3. Prof. Dr. Regine Heller**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 6. März 2017**

**“No great discovery was ever made without a bold guess”**

**- Issac Newton -**

## Zusammenfassung

**Hintergrund** Die intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) beschreibt ein fetales Wachstum unter dem genotypischen Potential des Feten (ACOG 2013). Die häufigste Ursache hierfür ist eine plazentare Insuffizienz, welche sich meist durch eine gestörte Umwandlung der maternalen Spiralarterien in weithumige, widerstandsarme Gefäße darstellt (Cetin und Antonazzo 2009). Eine Störung der Trophoblastinvasion und Interaktion mit den maternalen Endothelzellen wird als Ursache für die mangelhafte Umwandlung der Spiralarterien angenommen, die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch noch weitgehend unbekannt (Pijnenborg et al. 1980, Cartwright et al. 2010).

**Fragestellung und Ziele** Da die Wanderung von Trophoblastzellen entlang der maternalen Spiralarterien der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an das Endothel bei akuter Inflammation ähnelt, gingen wir der Hypothese nach, dass die vaskuläre Invasion von Trophoblastzellen durch die Expression von ähnlichen Adhäsionsmolekülen ermöglicht und reguliert wird (Burrows et al. 1994). Das Ziel dieser Arbeit ist es die Bedeutung auserwählter Adhäsionsmoleküle der extravillösen Trophoblastzellen für deren Interaktion mit maternalen Endothelzellen während der Plazentation zu identifizieren.

**Methoden** Die extravillöse Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo wurde hierfür mit den primären Endothelzellen HUVEC in einem dreidimensionalen Zellkulturmodell kokultiviert und die Zellinteraktion vor und nach sukzessiver Suppression der auserwählten Adhäsionsmoleküle verglichen und quantifiziert.

**Ergebnisse und Diskussion** Eine statistisch signifikante Beteiligung von N-Cadherin an der Migration und Interaktion von HTR-8/SVneo- mit HUVEC-Zellen in einer 3D-Kokultur auf Matrigel® konnte dargestellt werden. Daraus läßt sich eine Relevanz dieses Moleküls bei der Trophoblastinvasion *in vivo* vermuten. Auch nach Unterdrückung der Expression von CD162 zeigt sich eine verminderte Interaktion der Zelllinien, welche nach quantitativer Analyse jedoch nicht statistisch signifikant ist. VCAM-1 konnte als Mediator der HTR-8/SVneo- und HUVEC- Interaktion in der



3D-Kokultur weitestgehend ausgeschlossen werden, sodass auch eine *in vivo* Beteiligung unwahrscheinlich erscheint. Die Ergebnisse sollten unter Verwendung von primären extravillösen Trophoblastzellen verifiziert werden und eine Korrelation der Adhäsionsmolekülverteilung in Plazentabettbiopsien analysiert werden.

**Schlussfolgerung** Wir konnten zeigen, dass im Zellkulturmodell Adhäsionsmoleküle einen relevanten Einfluss auf die Zellinteraktion haben und eine Schlüsselrolle in dem multifaktoriellen Geschehen der Plazentationsstörung spielen könnten. Ohne wachsendes pathophysiologisches Verständnis der Plazentationsstörung wird die Entwicklung zukünftiger Screening- oder Therapieoptionen nicht möglich sein und die Folgen wie IUGR und Präeklampsie weiterhin mit sehr hoher fetaler sowie maternaler Morbidität und Mortalität verbunden sein.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Intrauterine Wachstumsretardierung .....	1
1.2 Die Plazenta und die gesunde Plazentation .....	2
1.3 Die Plazentationsstörung aufgrund fehlerhafter Trophoblastinvasion .....	5
1.4 Die Funktion der Adhäsionsmoleküle bei der Trophoblastinvasion .....	7
1.5 Ein <i>in vitro</i> Modellsystem zur Untersuchung der Endothel-Trophoblast-Interaktion ..	8
1.6 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe .....	10
1.6.1 Vergleich der Interaktionsmuster verschiedener Trophoblastzelllinien mit Endothelzelltubuli in der 3D-Kokultur auf Matrigel® .....	10
1.6.2 Differentielle Genexpression von ausgewählten Adhäsionsmolekülen in den verschiedenen Trophoblastzelllinien .....	11
1.7 Aufbau und Funktion der auserwählten Adhäsionsmolekülpaare .....	13
1.7.1 N-Cadherin .....	13
1.7.2 VCAM-1 und VLA-4 .....	14
1.7.3 P-Selektin und CD162 .....	14
<b>2 Ziele der Arbeit .....</b>	<b>16</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
3.1 Material .....	18
3.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme .....	18
3.1.2 Kits .....	20
3.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	20
3.1.4 Geräte .....	21
3.2 Methoden .....	23
3.2.1 Standardisierte Zellkultur .....	25
3.2.2 2D-Kokultur von Endothel- und Trophoblastezellen .....	28
3.2.3 3D-Kokultur auf Matrigel® .....	28
3.2.4 Quantitative Analyse der Zellinteraktion .....	30
3.2.5 Stimulation der Adhäsionsmolekülexpression mit TNF- $\alpha$ und VEGF .....	31
3.2.6 Stimulation von Trophoblastzellen mittels Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) und HUVEC konditioniertem ECGM .....	31

3.2.7	Suppression der Adhäsionsmolekülexpression durch siRNA vermitteltem Knockdown .....	32
3.2.8	Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot .....	33
3.2.9	Analyse der Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie .....	37
3.2.10	Analyse der Gene mittels PCR .....	38
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
4.1	Differentielle Expression der Adhäsionsmoleküle in den untersuchten Trophoblastzelllinien .....	41
4.1.1	Expression der Adhäsionsmoleküle in HTR-8/SVneo-, JEG-3-, AC-1M32-, AC-H3P- und HUVEC-Zellen .....	41
4.1.2	Genexpression des VCAM-1 Liganden VLA-4 in HTR-8/SVneo-, JEG-3-, AC-1M32-, AC-H3P- und HUVEC-Zellen .....	42
4.1.3	VCAM-1 Expression nach Stimulation mit Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF).....	43
4.1.4	Adhäsionsmolekülexpression in Trophoblastzellen nach Stimulation mit HUVEC-Medium (ECGM) oder mit, von HUVEC-Zellen, konditioniertem Medium ..	44
4.2	Spezifische Expressionsunterdrückung (Knockdown) der selektierten Adhäsionsmoleküle mittels kleiner Interferenzribonukleinsäuren (siRNA) .....	44
4.2.1	Knockdown von N-Cadherin .....	44
4.2.2	Knockdown von CD162 .....	48
4.2.3	Knockdown von VCAM-1 .....	50
4.3	Interaktionsanalyse von Trophoblastzellen mit Endothelzelltubuli in der dreidimensionalen Kokultur auf Matrigel® .....	52
4.3.1	Interaktion verschiedener Trophoblastzelllinien mit Endothelzelltubuli auf Matrigel® .....	52
4.3.2	Interaktionsanalyse nach Knockdown der als Kandidaten für die spezifische Interaktion identifizierten Adhäsionsmoleküle in HTR-8/Svneo-Zellen .....	54
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>59</b>
5.1	Kritische Betrachtung der angewandten Methoden .....	59
5.1.1	Zellkultur inklusive 3D-Kokultur auf Matrigel® .....	59
5.1.2	Quantifizierung der morphologischen Ergebnisse.....	62
5.1.3	Proteinnachweis.....	63
5.1.4	Genexpressionsanalyse.....	69
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	69
5.2.1	N-Cadherin .....	69
5.2.2	CD162 und ihr Ligand P-Selektin .....	71
5.2.3	VCAM-1 .....	72

5.2.4	Fetale oder maternale Dysregulation als Ursprung der IUGR?	75
5.2.5	Weitere Einflussfaktoren auf die Trophoblastinvasion	76
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>81</b>
7.1	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	81
7.2	Rohdaten der quantitativen Matrigelanalyse mittels Wimasys®	82
7.2.1	N-Cadherin	82
7.2.2	CD162	83
7.2.3	VCAM-1	83
7.3	Literaturverzeichnis	83
7.4	Lebenslauf	94
7.5	Danksagung	95
7.6	Ehrenwörtliche Erklärung	96

## Abkürzungsverzeichnis

®	<i>registered</i> , registrierte Marke
°C	Grad Celsius
2D, 3D	zweidimensional, dreidimensional
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AC-1M32	Hybrid aus humanem villösen Dritttrimestertrophoblast und JEG-3 Zelle
AC-H3P	Hybrid aus humanem villösen Ersttrimestertrophoblast und JEG-3 Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	<i>bovine calf albumin</i> , bovines Kälberalbumin
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CD162	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
CD34	hämatopoetisches Stammzellantigen
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
<i>ddH<sub>2</sub>O</i>	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
ECGM	<i>endothelial cell growth medium</i> , Endothelzellwachstumsmedium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i> ; epithelialer-mesothelialer-Übergang
et al.	<i>et alii/ et aliae</i> , und andere
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
g	<i>gravitational force</i> , Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAMDL	<i>goat anti-mouse DyLight</i> , Sekundärantikörper Anti-Maus für FACS
ggf.	gegebenenfalls
h	<i>hour</i> , Stunde
HCl	Hydrogenchlorid
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HTR-8/SVneo	immortalisierter humaner Ersttrimestertrophoblast
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i> , humane Nabelschnurvenenendothelzelle
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i> , interzelluläres Adhensionsmolekül 1
Ig	Immunglobulin
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> , Insulinähnlicher Wachstumsfaktor

IL	Interleukin
ITGA-4	Integrin alpha 4, Untereinheit des VLA-4 Rezeptors
IUGR	<i>intrauterine growth restriction</i> , intrauterine Wachstumsretardierung
JEG-3	Chorionkarzinomzelle
Kap.	Kapitel
kDa	kilo Dalton
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i> , Leukämie inhibierender Faktor
M	Molar
mA	Milliamper
MEL-CAM	<i>melanoma cell adhesion molecule</i> , Melanomzelladhäsionsmolekül
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Botenribonucleinsäure
N-Cadherin	neuronaes Cadherin
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
p53	Phosphoprotein 53
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i> , Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmolekül
pH	<i>pondus hydrogenii</i> , Potential von Wasserstoff
PLAU	Plasminogenaktivator Urokinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	Retinoblastomprotein
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i> , Radioimmunoprecipitationspuffer
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute 1640
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sFlt-1	<i>soluble fms-like tyrosine kinase-1</i> , VEGF-Rezeptor
SGP	Sammelgepuffer
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i> , kleine eingreifende Ribonukleinsäure
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA (-Puffer)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i> , transformierender Wachstumsfaktor beta
TGP	Trenngepuffer
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Intrauterine Wachstumsretardierung

Die intrauterine Wachstumsretardierung (engl. *intrauterine growth restriction*, IUGR) beschreibt ein Zurückbleiben des fetalen Wachstums hinter dem genotypischen Potential des Individuums. Als Indikator der IUGR dient eine Wachstumsrate unterhalb der 10. Perzentile einer Bevölkerungsgruppe (Sadler 2008, ACOG 2013). Mit 7-15% ist sie die wichtigste Ursache für perinatale Mortalität und Morbidität, wobei die perinatale Mortalitätsrate von IUGR Feten, im Vergleich zu gesunden um 10-20x erhöht ist (Cetin und Alvino 2009, Rosenberg 2008, Stevenson et al. 1998). Nach angeborenen Fehlbildungen ist die IUGR die häufigste Ursache für Totgeburten (ACOG 2009). Als Ursprung kommen genetische Mutationen des Feten, intrauterine Infektionen, sowie Drogenabusus oder chronische Erkrankungen der Mutter in Frage. Zugrundeliegend ist jedoch meist eine Minderversorgung des Feten mit Nähr- und Sauerstoff aufgrund einer Plazentainsuffizienz mit reduzierter utero-plazentarer Perfusion, sowie verändertem placentaren Transport und Metabolismus (Cetin und Antonazzo 2009, Sibley et al. 2005, Rosenberg 2008). Der rein placentaren Plazentainsuffizienz liegt eine eingeschränkte Umwandlung der maternalen Spiralarterien in weitlumige Gefäße zugrunde, die neben der IUGR auch Auslöser für weitere Schwangerschaftskomplikationen wie der Präeklampsie und Frühgeburten sein kann (Schneider H. 2002, Groten et al. 2010, Kim et al. 2003). Die molekularen Mechanismen dieser Gefäßumwandlung sind bisher allerdings noch weitgehend unbekannt.

Die Folgen der intrauterinen Wachstumsretardierung äußern sich neonatal durch Komplikationen der Thermoregulation, Hypo- oder Hyperglykämie, Hypokalzämie, Hyperbilirubinämie, Infektionen und eingeschränkte immunologische Abwehrkapazität, Gerinnungsstörungen, nekrotisierende Enterokolitis, Mekoniumaspirationssyndrom, perinatale Asphyxie, bronchopulmonale Dysplasie und persistierende pulmonale Hypertension (Bernstein et al. 2000, Lackman et al.

2001, Rosenberg 2008). Zusätzlich zu den kurzzeitigen neonatalen Belastungen kann es durch die eingeschränkte intrauterine Nahrungszufuhr auch zu einer langfristigen Adaptation des Feten an die suboptimalen Wachstumsbedingungen mit lebenslanger Veränderung des endokrin-metabolischen Systems und damit einem veränderten Risikoprofil für Erkrankungen im späteren Leben kommen (Barker 2006). Durch dieses *fetal programming* weisen betroffene Individuen ein erhöhtes Risiko für Hypertension, koronare Herzerkrankungen, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus Typ II, Nierenfunktionsstörungen, aber auch Schlaganfälle und Hirnentwicklungsstörungen auf (Kanaka-Gantenbein et al. 2003, Kaijser et al. 2008, Huxley et al. 2000, Whincup et al. 2008, Hallan et al. 2008, Blair und Stanley 1990).

Bisher gibt es keine Möglichkeit therapeutisch eine Verbesserung der fetalen Versorgung und damit des fetalen Wachstums bei IUGR zu bewirken. Weder Nahrungsergänzungsmittel, Sauerstofftherapie, noch Versuche die Plazentaperfusion durch Blutdruckregulation, Plasmaexpander, niedrigdosiertes Heparin/ Aspirin, oder Bettruhe zu erhöhen, zeigten einen signifikanten Einfluss (ACOG 2013).

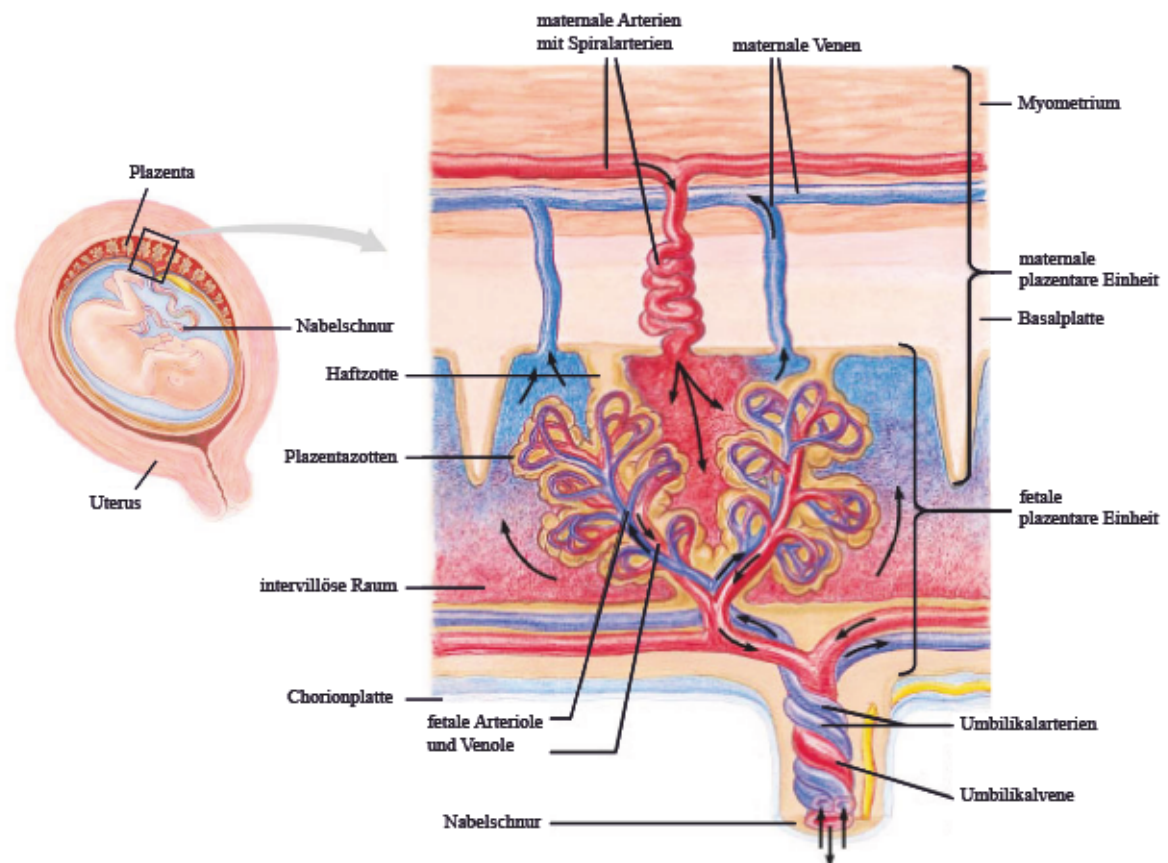
Aufgrund dessen ist die weitere Ursachenforschung der zugrundeliegenden Plazentationsstörung unentbehrlich für eine erfolgreiche Intervention bei der IUGR, aber auch anderer durch die mangelnde Gefäßumwandlung ausgelöster Krankheitsbilder.

## 1.2 Die Plazenta und die gesunde Plazentation

Über die Plazenta (lat. *placenta*, Mutterkuchen) erfolgt der Austausch von Nährstoffen und Sauerstoff zwischen Fetus und Mutter (Abb.1). Die Plazentation beginnt am sechsten Tag nach der Befruchtung mit Implantation der Blastozyste (altgr. *blaste kystis*, Keimblase) in die Uterusschleimhaut der Mutter. Sie besteht aus einem innen liegenden Embryoblasten umgeben von einer Zellschicht aus Trophoblastzellen. Die äußeren Trophoblastzellen differenzieren in der 2. Schwangerschaftswoche zu zwei Schichten: die aktiv proliferierenden Zytotrophoblastzellen und die, durch Zellfusion gebildeten, mehrkernigen Synzytiotrophoblasten (Sadler 2008). Infolge zunehmender

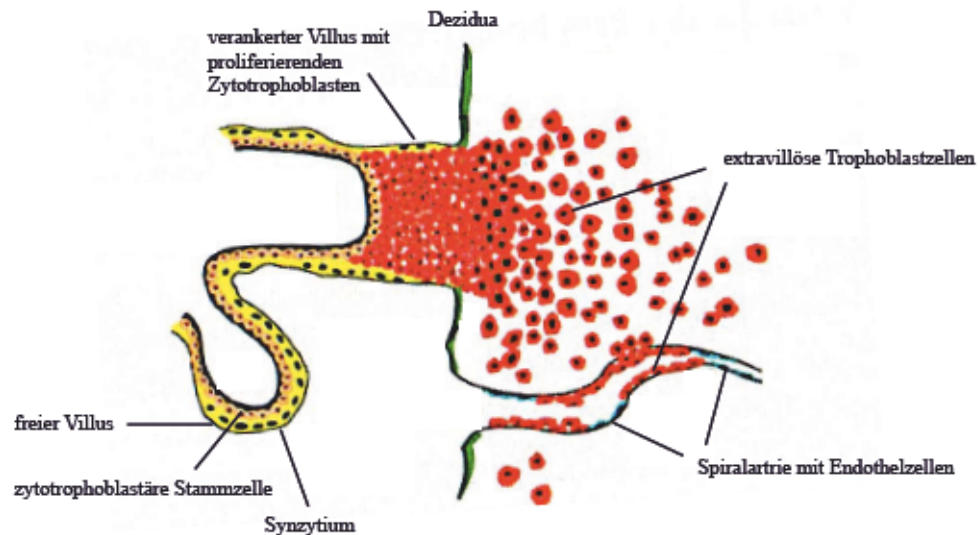


Zytotrophoblastproliferation dringen die Trophoblastzellen tiefer in das uterine Epithel ein, bilden jedoch über die Synzytiotrophoblastzellen zunächst noch eine klare Abgrenzung gegenüber der maternalen Dezidua (Schneider H. 2002). In der Synzytiotrophoblastschicht entstehen in der weiteren Entwicklung einzelne Vakuolen, welche zu einem kommunizierenden Netz aus Lakunen konfluieren. In die, zwischen den Lakunen gelegenen, Bälkchen aus Synzytium wachsen Zytotrophoblastzellen ein und bilden Primärzotten. Diese entwickeln sich durch Eindringen und Differenzierung von Mesodermzellen zu Sekundärzotten und ab Ende der 3. Schwangerschaftswoche zu Tertiärzotten mit Blutgefäßen (Sadler 2008). Durch das Vordringen der Trophoblastzellen in das maternale Stroma wird ab der 10-12. Schwangerschaftswoche die Dezidua durchbrochen und die, dort liegenden, mütterlichen Sinusoiden eröffnet. Blut strömt in die Lakunen ein (Huppertz et al. 2009). Der Kontakt mit dem maternalen Gewebe regt die Zellproliferation an der Spitze einiger Zotten an, sodass eine Trophoblastzellsäule entsteht, welche die fetale Frucht im maternalen Gewebe verankert (Abb.2) (Schneider H. 2002, James et al. 2012). Die Zellen am distalen Ende dieser Haftzotten verlieren den Kontakt mit der Basalmembran und differenzieren zu einem invasiven Phänotyp, welcher als extravillöser Trophoblast durch aktive Migration weiter in das maternale Gewebe vordringt (Kaufmann et al. 2003, Burrows et al. 1996). Unter dem Einfluss der auswandernden Trophoblastzellen beginnen die Hochwiderstandsgefäße der Mutter zu dilatieren (Nanaev et al. 1995, Kaufmann P 2002). Sobald die extravillösen Trophoblastzellen die maternalen Spiralarterien erreichen, heften sie sich an die dortigen Endothelzellen und drängen sich als endovaskuläre extravillöse Trophoblastzellen zwischen diese (Bulla et al. 2005, De Wolf et al. 1980). Dort führen sie durch zelluläre Interaktionen zu einer weiteren Dilatation des vaskulären Lumens (Robertson 1976, Brosens et al. 1967, Sadler 2008). Die Invasion der endovaskulären extravillösen Trophoblastzellen umfasst hierbei die Gefäße der Dezidua und des proximalen Drittels des Myometriums (Schneider H. 2002, Brosens et al. 2002). Die Spiralarterien präsentieren sich in Folge des Umbaus als weitlumig und widerstandsfrei mit entsprechend hohem Blutfluss, welcher von entscheidender Bedeutung für die normale Entwicklung der Plazenta und damit für den gesamten Schwangerschaftsverlauf ist (Huppertz und Peeters 2005, Kaufmann et al. 2003, Khankin et al. 2010).



**Abb. 1: Aufbau der humanen Plazenta**

Die Pfeile symbolisieren den placentaren Blutfluss. Ab der 12. Schwangerschaftswoche strömt maternales Blut aus den erweiterten Spiralarterien in den entstandenen intervillösen Raum ein und umspült die, mit fetalen Kapillargefäßen versehenen, Chorionzotten. Über Diffusion und aktiven Transport findet an den Zotten der Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind statt. Das nähr- und sauerstoffreiche Blut wird über die Nabelschnurvene an den fetalen Kreislauf und anschließend die fetalen Abfallprodukte über zwei Nabelschnurarterien zurück zu den Zotten geleitet. (Modifiziert nach Benjamin Cummings "From Egg to Embryo" Fig. 28.7f und 28.6g, 2006 Pearson Education, Inc.)



**Abb. 2: Differenzierungsweg der placentären Trophoblastzellen in verankerten Zotten**

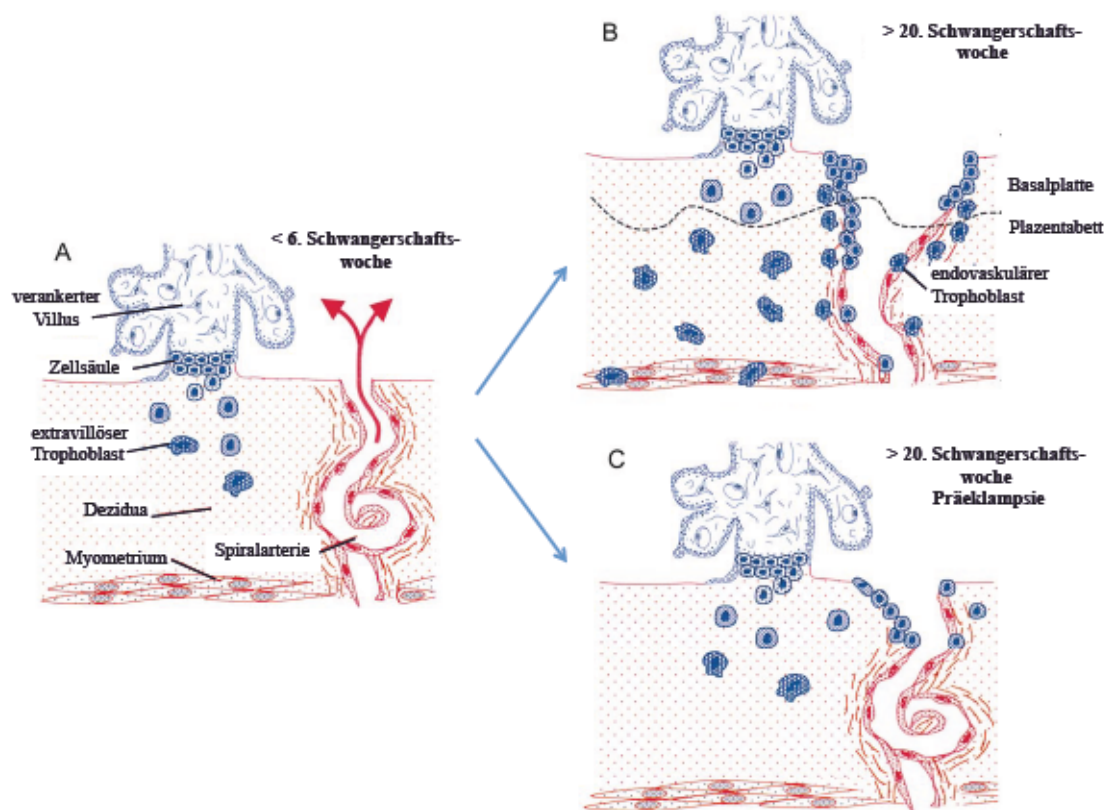
Der Kontakt des verankerten Villus mit der Dezipua stimuliert eine massive Zytotrophoblastproliferation und generiert eine Zellsäule. Am distalen Ende der Zellsäule lösen sich extravillöse Trophoblasten und invadieren das mütterliche Gewebe sowie die Spiralarterien bis in das proximale Myometrium. (Modifiziert nach Schneider H et al. „Bedeutung von Störungen der Implantation und der frühen Plazentaentwicklung für die Entstehung der Präeklampsie“, 2002.)

### 1.3 Die Plazentationsstörung aufgrund fehlerhafter Trophoblastinvasion

Bei der Plazentationsstörung ist die Umwandlung der maternalen Spiralarterien und damit der adäquate Gasaustausch und Transport von Nährstoffen zwischen der Mutter und dem Fetus gestört (Zygmunt 2002). Eine normale embryonale Entwicklung und das regelrechte fetale Wachstum ist somit gefährdet (Meegdes et al. 1988, Khankin et al. 2010). Es besteht unter anderem ein erhöhtes Risiko für Spontanaborte, Frühgeburten, IUGR und Präeklampsie (Jaffe und Woods 1993, Schneider H. 2002). In Ultraschalluntersuchungen zeigen Plazenten von IUGR-Feten schon im ersten Trimenon eine signifikante Volumenverminderung (Metzenbauer et al. 2002, Hafner 2002, Madazli et al. 2003, Aardema et al. 2001). Des Weiteren zeigten histologische Untersuchungen von Plazentabettbiopsien von Schwangeren mit IUGR eine vergleichsweise oberflächliche Invasion der extravillösen Trophoblastzellen in die



Dezidua mit einer unzureichenden Adaptation der Spiralarterien (Pijnenborg et al. 1980, Kaufmann et al. 2003, Zhou et al. 1997a, Gerretsen et al. 1981). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass eine Störung der Trophoblastinvasion oder -interaktion mit den maternalen Endothelzellen für eine mangelhafte Umwandlung der Spiralarterien in weitlumige, widerstandsarme Gefäße mit verantwortlich sein kann (Abb.3) (Kaufmann et al. 2003, Zhou et al. 1997a, Frenette und Wagner 1996, Kokkinos et al. 2010). Durch Erforschung, welche Faktoren während der Plazentation die Zelladhäsion und -invasion regulieren, könnte ein größeres Verständnis über die gesunde wie auch pathologische Plazentaentwicklung erlangt werden.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der gesunden und mangelhaften Trophoblastinvasion**

A) Plazentabett und unterplazentare Arterie in der normalen Schwangerschaft < 6. SSW  
 B) Physiologische Trophoblastinvasion in die Dezidua und das Myometrium mit Gefäßerweiterung > 20. SSW C) Mangelhafte Gefäßinvasion mit fehlender Infiltration des Myometriums durch die extravillösen Trophoblastzellen. Die uteroplazentaren Gefäße bleiben eng und widerstandsreich. (Modifiziert nach Kaufmann et al. "Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia", 2003.)

## **1.4 Die Funktion der Adhäsionsmoleküle bei der Trophoblastinvasion**

Für die regelrechte Ausbildung der Plazenta muss ein Teil der fetalen Zytotrophoblastzellen invasiv werden (Harris 2010, Kaufmann et al. 2003). Die Infiltration der maternalen Spiralarterien lässt sich hierbei in mehrere Teilschritte gliedern: die Lösung der Trophoblastzellen aus dem Zellverband der Zellsäulen, die Migration durch das maternale Gewebe und die Bindung und Interaktion mit den Endothelzellen der maternalen Arterien (Zhou et al. 1997b). Alternativ wird auch eine endovaskuläre Invasion von Trophoblastzellen diskutiert (Kaufmann et al. 2003, Pijnenborg et al. 1980, Pijnenborg et al. 2006). Sobald die Trophoblastzellen intravasal angelangt sind, dringen sie weiter entgegen des Blutstroms bis in das Myometrium vor (Pijnenborg et al. 2006). Diese Prozesse werden alle von einer sich verändernden Expression der Adhäsionsmoleküle auf den Trophoblastzellen begleitet (Zhou et al. 1997b, Harris 2010). Der typisch epitheliale Phänotyp der Trophoblasten in der Haftzotte wird zu einem mesenchymalen Typ während der Migration und schließlich zunehmend endothelial in der Interaktion mit den maternalen Gefäßen (Zhou et al. 1997b, Damsky und Fisher 1998, Kokkinos et al. 2010). Diese Umwandlung, aber auch der Kontakt mit den Endothelzellen, wird unter anderem über Cadherine, Selektine oder Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie vermittelt (Harris et al. 2009, Kokkinos et al. 2010). Eine erfolgreiche epithelial-mesenchymale Transformation wird durch die Ablösung einer E-Cadherin dominanten durch eine N-Cadherin dominante Expression identifiziert (Gheldof und Berx 2013, Nakajima et al. 2004). Des Weiteren zeigten die Ergebnisse von Zhou et al. (1997) gleichzeitig mit der Herabregulation von typisch epithelialen Adhäsionsmolekülen wie Integrin  $\alpha 6 \beta 4$  und E-Cadherin auf extravillösen Trophoblastzellen während der Invasion (Shih Ie et al. 2002, Floridon et al. 2000, Aplin 1993) eine Zunahme der Expression von endothelialen Membranmolekülen wie VE-Cadherin, PCAM-1, VCAM-1, Integrin  $\alpha 1 \beta 1$  und  $\alpha V \beta 3$  (Thirkill und Douglas 1999, Bulla et al. 2005, Damsky und Fisher 1998, Burrows et al. 1994). Inkubation mit Antikörpern gegen E-Cadherin verdreifachte die Invasivität von isolierten 1. Trimester Trophoblastzellen auf Matrigel. Antikörper gegen VE-Cadherin oder  $\alpha V \beta 3$  reduzierten sie wiederum (Zhou et al. 1997b). Für viele weitere Adhäsionsmoleküle

wurde in den letzten Jahren eine mögliche Beteiligung an der Trophoblastzellinvasion diskutiert. Eine Übersicht der an diesem Prozess beteiligten Adhäsionsmoleküle findet sich in einem Review von Harris et al.. Zu ihnen gehören NCAM, PECAM-1, Mel-Cam, ICAM-1, VCAM-1, E- und P- und L-Selektin, VE-Cadherin, E-Cadherin und Cadherin-11, sowie die Integrine  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 1$  (Harris 2010). Weitere sind CD9, CD31, CD44, CD82, CD146 und cdc42 (Zhang et al. 2012, Kaspi et al. 2013, Yurdakan et al. 2008, Liu et al. 2012). Diese Daten führten schon Ende der 90er Jahre zu der Hypothese, dass eine Fehlfunktion der Adhäsionsmolekülexpression zu einer deutlichen Minderung der Invasionstiefe von Trophoblastzellen führen kann und so pathogenetisch an der Entstehung von IUGR, Präeklampsie und Spontanaborten beteiligt sei (Zhou et al. 1997a, Ball et al. 2006, Yurdakan et al. 2008, Damsky und Fisher 1998). Burrows et al. beobachteten, dass die Wanderung von Trophoblastzellen entlang der maternalen Spiralarterien der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an das Endothel bei akuter Inflammation ähnelt. Sie postulierten daher, dass die vaskuläre Invasion von Trophoblastzellen durch die Expression von ähnlichen Adhäsionsmolekülen ermöglicht und reguliert wird (Burrows et al. 1994). Dieser Hypothese soll in der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden.

### **1.5 Ein *in vitro* Modellsystem zur Untersuchung der Endothel-Trophoblast-Interaktion**

Der Invasionsprozess der Trophoblastzellen in das humane uterine Gewebe lässt sich nicht *in vivo* beobachten. Die Erforschung des natürlichen und pathologischen Verlaufs ist deshalb auf Informationen beschränkt, welche von Endpunktuntersuchungen, Tiermodellen oder *in vitro* Beobachtungen stammen (Bischof 1997). Die Plazentation im Menschen ist einzigartig, so dass es kein optimales Tiermodell gibt (Carter 2007). Lediglich zwischen dem Menschen, dem Makak und dem Pavian besteht eine große Ähnlichkeit in der Invasion und Umwandlung der Spiralarterien (Carter 2007). Aufgrund der Haltung, Fortpflanzungshäufigkeit und ethischen Restriktion ist die Forschung an diesen



Tiermodellen allerdings nur sehr eingeschränkt möglich und die Etablierung geeigneter *in vitro* Modellsysteme von entscheidender Bedeutung.

Die Verwendung primärer Trophoblastzellen aus Ersttrimester-Abortmaterial steht nur eingeschränkt zur Verfügung. Des Weiteren beinhalten sie nach der Aufreinigung eine Mischung aus villösen und extravillösen Zellen, stellen *in vitro* rasch ihre Proliferation ein und zeigen eine hohe interexperimentelle Variabilität (Bilban et al. 2010, Bischof 1997). Aus diesen Gründen eignen sie sich für experimentelle Versuchsreihen in der Zellkultur nur sehr eingeschränkt. Im Laufe der Jahre wurden deshalb eine Reihe von immortalisierten Trophoblastzelllinien entwickelt, welche für die Untersuchung unterschiedlicher Trophoblasteigenschaften Anwendung finden. 1993 transfizierte die Arbeitsgruppe von Charles H. Graham an der Universität von Toronto das T Antigen des Simian Virus 40 in primäre extravillöse Trophoblastzellen und kreierte so die immortalisierte extravillöse Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo (Graham et al. 1993). Dieser Zelllinie wird zugeschrieben sich besonders als Modell für invasive extravillöse Trophoblastzellen zu eignen, während die aus Chorionkarzinom stammenden Zelllinien JEG-3 und die mit Chorionkarzinomzellen fusionierten Trophoblastzelllinien AC-1M32 (Dritttrimestertrophoblastzellen) und AC-H3P (Ersttrimestertrophoblastzelllinien) als Modell für villöse Trophoblastzellen betrachtet werden (Hannan et al. 2010, Suman und Gupta 2012, Bilban et al. 2010). Als Modell für die, an der Interaktion beteiligten, Endothelzellen der Spiralarterien verwendeten wir die Zelllinie HUVEC. Diese sind aus humanen Umbilikalvenen gewonnene primäre Endothelzellen, die käuflich erworben sehr ergiebig sind und genetisch gleiche Endothelzellen für eine Vielzahl unterschiedlicher Experimente liefern.

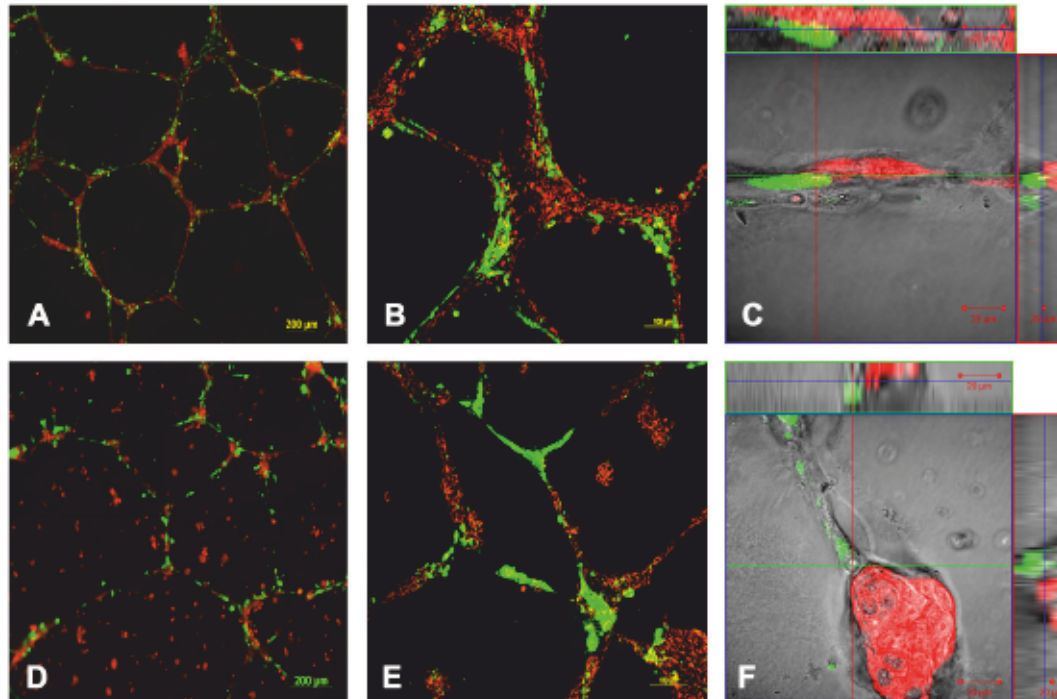
Um eine zusätzliche Annäherung an die *in vivo* Bedingungen der Zell-Zell-Interaktion zu erreichen, wurden dreidimensionale Kultursysteme aus Matrigel® für die Untersuchungen eingesetzt. Diese ermöglichen eine naturnähere Analyse der Zellfunktion, -invasion, -migration und -kommunikation, da die dreidimensionalen Wachstumsbedingungen Einfluss auf Proteinexpression und das Zellverhalten nehmen (Scherberich und Beretz 2000, Highet et al. 2012, Aldo et al. 2007, Helige et al. 2008).

## 1.6 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

### 1.6.1 Vergleich der Interaktionsmuster verschiedener Trophoblastzelllinien mit Endothelzelltubuli in der 3D-Kokultur auf Matrigel®

Der Hypothese folgend, dass die Interaktion zwischen Trophoblastzellen und Endothelzellen spezifisch für die invasive Form der Trophoblastzellen ist wurde zunächst das Interaktionsverhalten zwischen verschiedenen Trophoblastzelllinien und Endothelzellen in der 3D-Kokultur auf Matrigel® untersucht. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, ob die Interaktion der extravillösen Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo mit HUVEC-Zelltubuli auf Matrigel® sich von jener der villösen Trophoblastzelllinien JEG-3, AC-1M32 und AC-H3P unterscheidet (Klas 2010). Dafür wurden HUVEC-Zellen mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff markiert und auf Matrigel® kultiviert. Innerhalb von 24 h kam es zur Ausbildung tubuliartiger Netzstrukturen der HUVEC-Zellen. Anschließend wurden, mit rotem Fluoreszenzfarbstoff markierte, Trophoblastzellen der jeweils verschiedenen Zelllinien hinzugegeben. Die morphologische Beurteilung der Zell-Zell-Interaktion fand nach weiteren 24 h mit dem Fluoreszenzmikroskop AxioObserver Z1 der Firma Zeiss statt. Die Aufnahmen in Abbildung 4 zeigen, dass extravillöse HTR-8/SVneo-Zellen verglichen mit villösen Trophoblastzelllinien deutlich verschieden mit HUVEC-Zellen interagieren. HTR-8/SVneo-Zellen lagern sich nahezu perfekt an Endothelzelltubuli an, während die Trophoblastzellen der Zelllinien JEG-3, AC-1M32 und AC-H3P eher verteilt im Matrigel® wachsen und mit den Endothelzellen nur zufällig interagieren. Ausgehend von dieser Beobachtung wurden die Trophoblastzelllinien und Endothelzellen hinsichtlich ihres Adhäsionsmolekülexpressionsmusters auf mRNA-Ebene untersucht.





**Abb. 4: Interaktion verschiedener Trophoblastzelllinien mit Endothelzelltubuli in der 3D-Kokultur auf Matrigel®**

Aufnahmen der 3D-Kokultur von Trophoblastzellen (rot) mit Endothelzellnetzen (grün) auf Matrigel® mit dem Epifluoreszenzmikroskop *AxioObserver Z1* der Firma Zeiss (10x Objektiv) und der dazugehörigen Software *AxioVision Imagingsoftware*®. HTR-8/SVneo-Zellen (A-C) lagern sich, im Vergleich zu den villösen Trophoblastzelllinien, hier beispielhaft JEG-3-Zellen, nahezu perfekt an die HUVEC-Netze an.

### 1.6.2 Differentielle Genexpression von ausgewählten Adhäsionsmolekülen in den verschiedenen Trophoblastzelllinien

Zur Identifizierung der molekularen Grundlagen der unterschiedlichen Trophoblast-Endothelzell-Interaktionen wurde die differentielle Expression ausgewählter Adhäsionsmoleküle in den Zelllinien untersucht. Ziel war es dabei, die Molekülpaare zu identifizieren, welche von HTR-8/SVneo- und HUVEC-Zellen, nicht aber von den villösen Trophoblastzelllinien (JEG-3, AC-1M32 und AC-H3P) exprimiert werden. Alle ausgewählten Kandidatenproteine vermitteln homo- und heterologe Kontakte von Endothelzellen und vermitteln deshalb potentiell die Wechselbeziehungen mit den Trophoblastzellen. Untersucht wurde die Expression der an homologen Zell-Zell-Interaktionen beteiligten Cadherine N-, E- und VE-Cadherin, die Zelladhäsionsmoleküle VCAM-1, ICAM und PECAM, sowie die Selektine P-, L- und

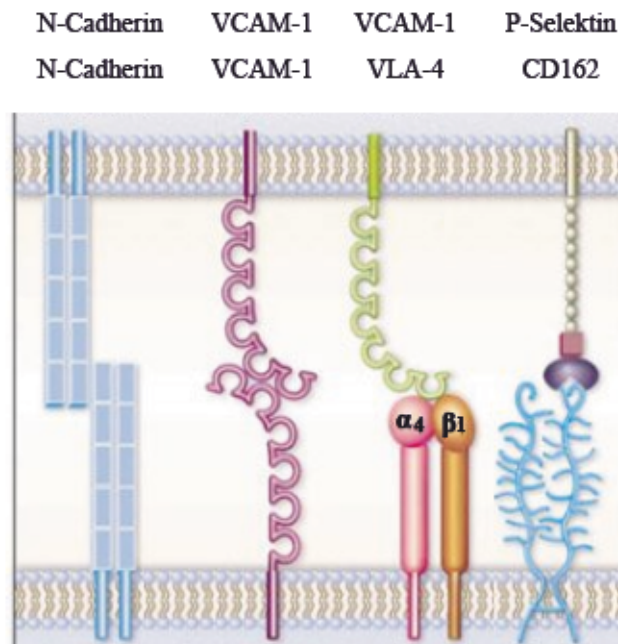
E-Selektin und deren Liganden CD162, CD34 und CD147, sowie der, an VCAM-1 bindende, Integrindimer VLA-4. Die Genexpression wurde mittels PCR untersucht. Die Ergebnisse der Analysen identifizierten die homolog interagierenden Adhäsionsmoleküle N-Cadherin und VCAM-1 und das heterolog interagierende Selektin-P mit seinem Liganden CD162 als potentiell beteiligte Proteine an der engen HTR-8/SVneo und HUVEC-Interaktion (Tab. 1) (Klas 2010). Obwohl L-Selektin und CD34 auch Kandidaten für eine spezifische Interaktion darstellten, war ihr Nachweis unzuverlässig. Aufgrund dessen wurde ihrer potentiellen Beteiligung an der fehlerhaften Trophoblastinvasion in dieser Arbeit nicht nachgegangen.

**Tab. 1: Ergebnisse der mRNA-Analyse für die selektierten Adhäsionsmoleküle**

Horizontal die Darstellung der Zelllinien, vertikal der Adhäsionsmoleküle. Ein Plus (+) kennzeichnet den positiven Nachweis des Moleküls auf mRNA-Ebene.

	HUVEC	HTR-8	JEG-3	H3P	1M32
VE-Cadherin	+	-	-	-	-
N-Cadherin	+	+	-	-	-
E-Cadherin	-	-	+	+	+
ICAM-1	+	+	+	+	+
PECAM-1	+	-	-	-	-
VCAM-1	+	+	-	-	-
VLA-4	+	+	-	-	-
E-Selektin	+	+	+	+	+
CD147	+	+	+	+	+
L-Selektin	+	-	-	-	-
CD34	+	+	-	-	-
P-Selektin	+	-	-	-	-
CD162	+	+	-	-	-

## 1.7 Aufbau und Funktion der auserwählten Adhäsionsmolekülpaare



**Abb. 5: Schematischer Aufbau der untersuchten Adhäsionsmoleküle**

Untereinander die Abbildung der jeweiligen Interaktionspartner. (Modifiziert nach Frenette, PS, Wagner, DD. *Adhesion molecules--Part 1. N Engl J Med.* 334:1526-1529. 1996)

### 1.7.1 N-Cadherin

Cadherine gehören zur Familie der Zelladhäsionsmoleküle (*engl. cell adhesion molecules; CAMs*) und sind Calcium abhängige integrale Membranglykoproteine, welche vorwiegend homophile Zell-Zell-Kontakte und Interaktionen vermitteln (Maitre und Heisenberg 2013). Vor allem während der Embryogenese und bei der Gewebshomeostase sind sie von entscheidender Bedeutung (Breier et al. 2014). Durch die Interaktion der N-terminalen, d.h. der extrazellulären Domänen, wird ein Kontakt zur Nachbarzelle hergestellt, welcher intrazellulär über Catenine an das Zytoskelett weitergeleitet wird und neben mechanischen Funktionen auch Einfluss auf verschiedene Signalkaskaden und die Expression von Wachstumsfaktoren innerhalb der Zellen nimmt (Giampietro et al. 2012, Kokkinos et al. 2010, Yap et al. 2007).

N-Cadherin (*engl. neural-cadherin*) (130 kDa) wird in Nervenzellen, mesenchymalen und endothelialen Zellen exprimiert und beeinflusst die Expression von Zellregulationsproteinen. Diese sind essentiell an der Zellproliferation, Migration und Invasion der Zellen beteiligt (Kokkinos et al. 2010). Folgerichtig wird N-Cadherin beim Übergang von Epithelzellen in einen mesenchymalen Phänotyp vermehrt exprimiert (*engl. epithelial-to-mesenchymal-transition; EMT*). Dieser ist in der Tumorgenese, aber auch in der Umwandlung der villösen zu extravillösen Trophoblastzellen, von entscheidender Bedeutung. Es folgt ein Verlust der engen Zellkontakte und der basal-apikalen Zellpolarität sowie eine Zunahme des proliferativen, invasiven Charakters der Zellen (Nakajima et al. 2004, Gheldof und Berx 2013, Kokkinos et al. 2010). Eine Funktion bei der Interaktion zwischen endothelialen und nicht endothelialen Zellen ist für N-Cadherin ebenfalls beschrieben (Breier et al. 2014).

#### 1.7.2 VCAM-1 und VLA-4

VCAM-1 (*engl. vascular cell adhesion molecule-1; CD106*) (110 kDa) ist ein Immunglobulin der Familie der Zelladhäsionsmoleküle und wird auf dem Gefäßendothel, im Knochenmark und in lymphatischem Gewebe exprimiert. Nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen steigt die Expression von VCAM-1 erheblich (Yurdakan et al. 2008, Osborn et al. 1992). Die häufigste Form von VCAM-1, VCAM-7D, hat sieben extrazelluläre Domänen. VCAM-1 kann sowohl homologe, wie auch heterologe Bindungen eingehen. Über Domäne eins oder vier wird der Kontakt mit dem  $\alpha 4\beta 1$ -Integrindimer VLA-4 (*engl. very late integrin-4; CD49d/CD29*) (150 kDa) hergestellt (Osborn et al. 1992, Prados et al. 2011). Hierrüber vermittelt es sowohl die Wanderung (*rolling-typ adhesion*) wie auch die Adhäsion von Zellen und ist an der Zellerkennung beteiligt. Mittels *clustering* der VCAM-1-Moleküle erfolgt darüber hinaus die Signaltransduktion in die adhärierende Endothelzelle (Prados et al. 2011, van Buul und Hordijk 2009, Hahne et al. 1994).

#### 1.7.3 P-Selektin und CD162

Selektine sind Zelladhäsionsmoleküle der Familie der membrangebundenen Glykoproteine und lassen sich in drei Arten untergliedern: E-, L-, und P-Selektine.



P-Selektin (*engl. platelet-selectin*) (140 kDa) wird auf aktivierten Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert und vermittelt das Anheften und Wandern (*rolling*) von Leukozyten und Thrombozyten auf Endothelzellen. Diese Interaktionen bilden die Voraussetzung für eine erfolgreiche feste Adhäsion und gegebenenfalls transendotheliale Migration der Zellen (Moore 1998).

CD162 (*engl. P-selectin glycoprotein ligand-1; PSGL-1*) ist ein homodimeres Glykoprotein aus zwei, über Disulfidbrücken verbundene, Untereinheiten von jeweils 120 kDa Größe. Es befindet sich vorwiegend auf den Mikrovilli von Leukozyten, kann jedoch ebenfalls auf anderen hämatopoetischen Zellen gefunden werden. Es bindet an P-, L-, oder E-Selektine. Weiterhin zeigte Moore mittels immunohistochemischer Analyse das Vorkommen von CD162-Antigen im Epithel des Eileiters (Moore 1998). Dies lässt vermuten, dass die Expression von CD162 nicht auf hämatopoetisches Gewebe beschränkt ist und möglicherweise weitere Funktionen erfüllen kann.

Die Bindung von CD162 an P-Selektin erfolgt Calcium abhängig über das extrazelluläre NH<sub>2</sub>-Terminal des CD162-Polypeptides. Zusammen vermitteln sie leukozyt-endotheliale und leukozyt-thrombozytäre Adhäsionen. Es wurde beobachtet, dass ein Fehlen von CD162 auf eosinophilen und T-Zellen zu einer Aufhebung der Zell-Zell-Kontakte und Wanderung (*rolling*) dieser Zellen über P-Selektine führt (Moore 1998, Taylor et al. 2000). Nach Slotta et al. wurde zusätzlich durch Immunneutralisation von CD162 und P-Selektin in Mäusen, eine signifikante Minderung der Thrombozyten- sowie Leukozytenrekrutierung, -wanderung und -adhäsion beschrieben (Slotta et al. 2009). Eine mögliche Beteiligung an der Signaltransduktion wird ebenfalls diskutiert (Taylor et al. 2000).

## 2 Ziele der Arbeit

Eine fehlerhafte Trophoblastinvasion während der Plazentation führt zu deutlich weniger Trophoblastzellen am maternalen Endothel (Kaufmann et al. 2003, Pijnenborg et al. 2006). Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass eine Störung der differentiellen Expression von Adhäsionsmolekülen auf extravillösen Trophoblastzellen eine mögliche Ursache für deren verminderte Invasion und der unvollständigen Gefäßreifung sei (Damsky und Fisher 1998, Zhou et al. 1997a). In der vorangegangenen experimentellen Arbeit konnten potentielle Partner für die Interaktion von der extravillösen Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo und den primären Endothelzellen HUVEC identifiziert werden (Klas 2010). In dieser Arbeit soll die differentielle Expression auf Proteinebene bestätigt werden und die Funktionalität der Expression für die Interaktion nachgewiesen werden.

Folgende **Arbeitshypothesen** wurden aufgestellt:

Die Interaktion von Endothelzellen mit Trophoblastzellen wird, wie bei der Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blut an und durch das Endothel, über Adhäsionsmoleküle vermittelt. Die homologe N-Cadherin und VCAM-1, sowie CD162 und sein Ligand P-Selektin sind für eine regelrechte Trophoblast-Endothel-Interaktion von Bedeutung. Eine Unterdrückung der Expression dieser Adhäsionsmoleküle in invadierenden Trophoblastzellen verhindert die Interaktion mit den Endothelzelltubuli in der Zellkultur.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen soll die Expression von den genannten Adhäsionsmolekülen in der extravillösen Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo manipuliert und die daraus resultierende Veränderungen auf ihre Interaktion mit Endothelzelltubuli in einer 3D-Kokultur auf Matrigel® analysiert werden. Die Unterdrückung der Molekülexpression erfolgt mittels Transfektion von spezifischer siRNA und wird durch Protein- und Genanalyse kontrolliert. Die Zellinteraktion wird mikroskopisch beurteilt und die gewonnenen Aufnahmen objektiv und standardisiert quantifiziert und anschließend statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen könnten Aufschluss über einen Pathomechanismus der

Plazentationsstörung leisten und zu der Entwicklung von Therapie- und Screeningoptionen für Schwangerschaftskomplikationen wie die IUGR beitragen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme

**Tab. 2: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Enzyme**

Chemikalien/ Reagenzien/ Enzyme	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT) $\geq 99\%$ , p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol 99 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol (Isopropanol) ROTIPURAN $\geq 99.8\%$ , p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
6x Orange DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Waltham MA, USA
Accutase	PAA The Cell Culture Company Pasching/Linz, Österreich
Acrylamid/ Bis Solution 30% (29:1)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Agarose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS) $\geq 98\%$ , p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BD FACSClean™ Solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACSTFlow™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACSRinse™ Solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Flow Count™ Fluorospheres	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V $\geq 98\%$ , pulv.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Fluka analytical Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
CellTracker™ Green CMFDA Dye, Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Oregon USA
Descosept AF	Dr. Schuhmacher GmbH, Malsfeld, Deutschland
destilliertes Wasser, DNase/RNase frei, Gibco®	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Waltham MA, USA
DharmaFECT® Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Waltham MA, USA ehemals Thermo Scientific Dharmacon®
Dimethylsulfoxid (DMSO) $\geq 99.9\%$ , p.a.	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dinukleotidtriphosphate (dNTPs) dATP, dCTP,	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH,



dGTP und dTTP	Waltham, MA, USA
<i>Dream-Taq</i> DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Waltham, MA, USA
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne Calcium und Magnesium, steril	PAA The Cell Culture Company Pasching/Linz, Österreich
Ethanol ROTIPURAN $\geq 99.8\%$ , p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) $\geq 99\%$ , p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
fetales Kälberserum (FKS)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerin $\geq 98\%$ , wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin $\geq 99\%$ für Analyse	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Luminata Forte Western HRP Substrat</i>	Merck Millipore Darmstadt, Deutschland
<i>Maxima Reverse Transcriptase</i>	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Waltham MA, USA
Methanol $\geq 99.5\%$ , p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>MitoTracker® Deep Red<sup>FM</sup></i> , Invitrogen <sup>TM</sup>	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Oregon USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumazid	Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
Natriumchlorid $\geq 99.5\%$ p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Natriumdesoxycholat $\geq 98\%$ , p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS), Pellets	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Gibco, Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Waltham, MA, USA
<i>O'Gene ruler 50 bp DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Waltham MA, USA
Oligo-dT-Primer	Sigma Aldrich, selbstdesigned Steinheim, Deutschland
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Waltham, MA, USA
Polyethylenglycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl ether (Triton-X 100)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Polymerase Puffer	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Waltham, MA, USA
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Protease Inhibitor Mix HP	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (20 000x)</i>	Intron Biotechnology Inc., Korea
RNase-Inhibitor	RiboLock, Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Waltham, MA, USA
siRNA Puffer, RNase frei	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Waltham MA, USA

Tris-acetate-EDTA (TAE)-Puffer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan -Hydrochlorid (Tris-HCl), TRIZMA-Hydrochlorid	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Base (Tris-Base), TRIZMA	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypanblau (0,4% in PBS)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,05%/ 0,02% in PBS)	PAA The Cell Culture Company Pasching/Linz, Österreich
Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ )	ImmunoTools Friesoythe, Deutschland
vascular endothelial growth factor (VEGF)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
VECTASHIELD® HardSet™ Mounting Medium	Vector Laboratories Inc., Burlingame CA, USA

### 3.1.2 Kits

**Tab. 3: Verwendete Kits**

Kit	Reagenzien	Hersteller
<i>inmuPREP RNA Mini Kit und inmuPREP DNase I digest Kit</i>	RL (Lyserreagenz), 70% Ethanol, HS (salzreiche Waschlösung), LS (salzarme Waschlösung), DNase I Verdaupuffer, DNase I inmuPREP 20 U/ $\mu$ l, Nuklease-freies Wasser	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
<i>Pierce® BCA Protein Assay Kit</i>	Reagenz A und B, Albumin Standard (2 mg/ ml)	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Waltham MA, USA

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Material	Bezeichnung	Hersteller
Blotmembran	PVDF Transfer Membran, 0,45 $\mu$ m für Western Blot	ThermoScientific, Rockford IL, USA
Deckgläser	Menzel-Deckgläser 24 x 50mm	ThermoScientific, Braunschweig, Deutschland
Filterpapier	Filterpapier für Western Blot 0,4mm stark	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Kryogegefäße	2 ml Kryogegefäße mit Innengewinde	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhäusen, Deutschland
Matrigel-Kammer	<i>BD Falcon™ Culture Slides, 4 Chamber Polystyrene Vessel, Tissue Culture Treated Glass Slide</i>	BD Biosciences, Bedford MD, USA
Mikrowellplatte	<i>Cellstar® 96 Well Cell Culture Plate, flat bottom</i>	Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc., Braunschweig, Deutschland
Pasteurpipetten (150/ 230 mm)	Assistant® Pipetten	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sonderheim/Rhön, Deutschland
PCR Papier	<i>PCR paper</i>	Thermo Fisher Scientific, Biosciences

		GmbH, Waltham MA, USA
Pipetten (2/ 5/ 10/ 20 ml)	<i>Cellstar® Serological Pipettes</i>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (1000/ 200/ 20/ 10 µl)	Plastibrand Universalspitzen	Brand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen für Gelelektrophorese	<i>GELoader® Tips 0,5-20 µl</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen für PCR	<i>Quali-Maximum Recovery Tips 01-10 µl</i>	Kisker Biotech GmbH & Co. KG Steinfurt, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5/ 1/ 2 ml)	<i>Safeseal Microtubes,</i>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (15/ 50 ml)	<i>Cellstar® Tubes, PP- Schraubverschlussröhrchen</i>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße für PCR (1,5 ml)	<i>Micro-centrifuge tubes for high G-force</i>	VWR Int., Radnor PA, USA
Reaktionsgefäße für PCR (2 ml)	<i>Micro-centrifuge tubes with Graduations</i>	VWR Int., Radnor PA, USA
Wellplatten	<i>Cellstar® 6 Well Cell Culture Plate</i>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen (25/ 75 cm <sup>2</sup> ) mit Filterschraubverschluss	<i>Cellstar® Zellkulturflaschen für adhärent wachsende Zellkulturen</i>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	<i>Cell Scraper steril</i>	Sarstedt inc. Newton NC, USA

### 3.1.4 Geräte

**Tab. 5: Verwendete Geräte**

Gerätetyp	Gerätename	Hersteller
Blotapparat	<i>Fastblot™</i>	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Chemikalienabzug	Abzug ohne HOSCH-Filter	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Durchflusszytometer	<i>BD FACSCalibur™</i>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresekammer	Model 40-1214 Class II (horizontal)	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
	<i>PerfectBlue™</i> Doppelgelelektrophoresensystem <i>Twin S</i> , Model 45-1010 (vertikal)	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	AxioObserver Z1	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Folienschweißgerät	“Folio” FS3602	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
Gel-Dokumentationssystem	MF-ChemiBIS 3.2	DNR Bio-Imaging-Systems, Jerusalem, Israel
Gummisauger	Gummisauger	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Inkubator	HERACELL 150i CO <sub>2</sub> Incubator	Thermo Fisher Scientific, Biosciences GmbH, Waltham MA, USA
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Mikrowelle	Lifetec Microwave	Lifetec Electronics GmbH, Essen, Deutschland

PCR-Arbeitsstation	<i>DNA/RNA UV-Cleaner</i> , UVC / T-M-AR	Kisker Produkte für die Biotechnologie, Steinfurt, Deutschland
pH-Elektrode	<i>F20 FiveEasy™ pH</i>	Mettler-Toledo International Inc., Giessen, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Power Supply (Elektrophorese)	Consort EV231	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
	<i>Power Source Type: 300 V</i>	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius AX224	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Schüttler (rotierend)	Multi Bio RS-24	Biosan Ltd., Riga, Latvia
Schüttler (taumelnd)	<i>Orbital Polymax 1040</i>	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Schüttler/ Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Spektrometer	SPECTROstar Omega UV/Vis Absorptionsspektrometer	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland
	NanoDrop ND-1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Sterilwerkbank	HERAsafe HS12, HERAEUS Instruments	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, Waltham MA, USA
Thermocycler	<i>Mastercycler ep gradient S</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	<i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vakuumpumpe	<i>BioChem VacuCenter BVC 21NT</i>	Vaccubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Waage	Kern 440-47N	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Wasserbad	GFL-1003	Hilab Düsseldorf, Deutschland
Zellzählkammer	Neubauer-Zählkammer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugen	Universal 30 F	Hettich Lab Technology, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
	Micro 22R	Hettich Lab Technology, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland



3.2 Methoden

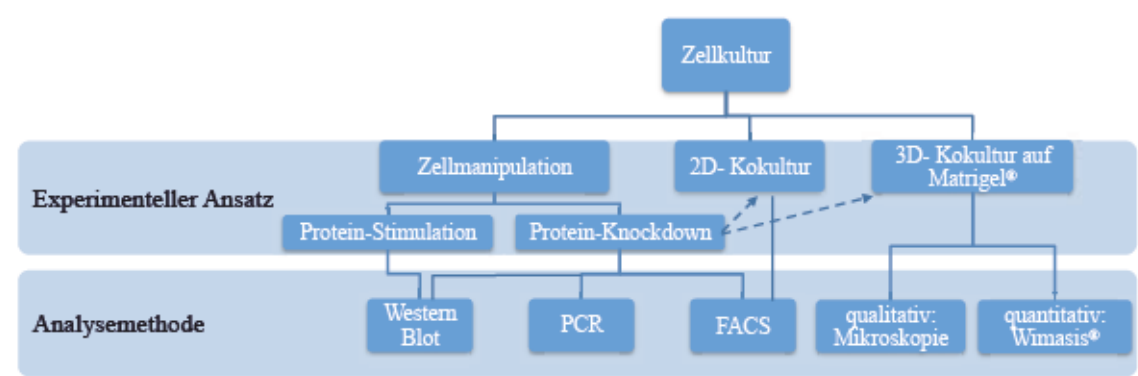


Abb. 6: Methodenübersicht

Tab. 6: Methodenübersicht

Experimenteller Ansatz	Verwendete Methode	Analysemethode
Zellkultur	standardisierte Zellkultur	Zellpellets und Proteinlysate
	2D-Kokultur	FACS
	3D-Kokultur auf Matrigel®	Mikroskopie und Wimasis Image Analysis®
Zellmanipulation	Stimulation der Adhäsionsmolekül-expression mit TNFα, VEGF und konditioniertem Medium	Western Blot
	Suppression der Adhäsionsmolekülexpression durch siRNA vermitteltem Knockdown	Western Blot, FACS und PCR
Analyse	Analyse der Proteinexpression	Western Blot und FACS
	Analyse der Gene	PCR
	Zellinteraktionsanalyse	Mikroskopie und Wimasis Image Analysis®

**Tab. 7: Verwendete Zelllinien und Medien**

Dargestellt sind die Endothelzelllinie HUVEC und die unterschiedlichen Trophoblastzelllinien. Die AC1-1 Zelllinie wurde aus Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT)-negativen JEG-3-Zellen entwickelt.

<b>Zelllinie</b>	<b>Model für</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Medium</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>HUVEC</b> ( <i>human umbilical vein endothelial cell</i> )	Endothelzelle der Spiralarterien	Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen ( <i>pooled</i> )	ECGM (Endothelial Cell Basal Medium mit Supplement Mix, PromoCell, C-22010) mit 10% FKS (Sigma Aldrich)	PromoCell, C-12253 Heidelberg, Deutschland
<b>HTR-8/SVneo</b>	extravillöser Ersttrimester-trophoblast	durch Transfektion mit dem Simianvirus 40 (SV40) T-Antigen immortalisierte humane Ersttrimestertrophoblastzellen	RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640 mit L-Glutamin (PAA, E15-840) mit 10% FKS (Sigma Aldrich)	freundliche Bereitstellung von C.H. Graham, Kingston, Kanada
<b>JEG-3</b>	villöser Cytotrophoblast	Chorionkarzinomzellen aus einer zerebralen Metastase; während der Autopsie entnommen und kurzzeitig in einer Hamsterbacke vermehrt	Ham's F12 mit L-Glutamin (PAA, E15-813) mit 10% FKS (Sigma Aldrich)	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), ACC 463 Braunschweig, Deutschland
<b>AC-H3P</b>	villöser Ersttrimester-trophoblast	Hybrid aus humanen Ersttrimestertrophoblastzellen (12 Wochen) und der Zelllinie AC1-1	Ham's F12 mit L-Glutamin (PAA) mit 10% FKS (Sigma Aldrich)	freundliche Bereitstellung von B. Huppertz Aachen, Deutschland
<b>AC-1M32</b>	villöser Dritttrimester-trophoblast	Hybrid aus humanen Dritttrimestertrophoblastzellen und der Zelllinie AC1-1	Ham's F12 mit L-Glutamin (PAA) mit 10% FKS (Sigma Aldrich)	DSMZ, ACC 442 Braunschweig, Deutschland
<b>AC-1M59</b>	villöser Dritttrimester-trophoblast	Hybrid aus männlichen, humanen Dritttrimestertrophoblastzellen und der Zelllinie AC1-1	Ham's F12 mit L-Glutamin (PAA) mit 10% FKS (Sigma Aldrich)	DSMZ, ACC 455 Braunschweig, Deutschland

### **3.2.1 Standardisierte Zellkultur**

Sämtliche Arbeiten mit lebenden Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Inkubation aller Zelllinien (Tab. 7) erfolgte immer bei 37°C in einer 5% kohlenstoffdioxidhaltigen Atmosphäre. Den jeweiligen zellspezifischen Medien wurde 10%, zuvor 30 min bei 56°C hitzedeaktiviertes, fetales Kälberserum (FKS) zugesetzt. Auf einen Gebrauch von Antibiotika wurde verzichtet. Eine Erwärmung der jeweils verwendeten Reagenzien auf 37°C fand, vor Gebrauch, im Wasserbad statt.

#### ***3.2.1.1 Passagieren von adhärenenten Zellen***

Alle proliferierenden Zellkulturen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80-90% passagiert. Dabei wurde das verbrauchte Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend enzymatisch mittels Trypsin/ EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst. Nach einer zelltypspezifischen Inkubationszeit von 3-7 min und mikroskopischer Kontrolle der Ablösung, erfolgte die Resuspension der Zellen in zellspezifischem Medium und die Ausplattierung auf eine frische Zellkulturflasche. Die Passagenummer erhöhte sich abschließend, unabhängig vom Splittverhältnis, um jeweils eine Ziffer.

#### ***3.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl***

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Es wurden 10 µl einer Zellsuspension mit 10 µl 0,4% Trypanblau in PBS vermischt und auf die Zählkammer aufgetragen wurde. In 4 Quadranten wurden die Zellzahlen der lebenden, nicht von Trypanblau angefärbten Zellen ermittelt und der Mittelwert berechnet. Dieser wurde anschließend verwendet um, unter Berücksichtigung der Verdünnung, die durchschnittliche Zellzahl pro ml nach folgender Formel zu kalkulieren:

$$(\text{Zellzahl/ ml} = \text{Mittelwert der lebenden Zellen} * 10\,000 * \text{Verdünnung})$$

### **3.2.1.3 Herstellung von Kryokonserven**

Bei einer Zellkonfluenz von 85-100% wurde das Medium der Zellen entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, mittels Trypsin/ EDTA-Lösung vom Kulturflaschenboden gelöst und erneut in zellspezifischem Medium resuspendiert. Die Suspension wurde, nach mehrmaligem Überspülen des Flaschenbodens, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellzahl bestimmt. Währenddessen erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 250 g für 4 min, sodass der Überstand von dem Zellpellet getrennt werden konnte. Entsprechend der berechneten Gesamtzellzahl wurde das Zellpellet in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert (1,2 bis  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ ml Einfriermedium) und unmittelbar in, auf Eis stehende, Kryogegefäße gefüllt. Alle Zellen wurden in einem, jeweils zellspezifischem, Einfriermedium kryokonserviert. Die Kryokonserven wurden zügig in ein Einfriergefäß mit Isopropanol gestellt und über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Bei Bedarf konnten sie am nächsten Tag in den Stickstofftank überführt werden.

*Einfriermedium:*            10% DMSO, 45% FKS, 45% zellspezifisches Medium (Tab. 7)

### **3.2.1.4 Rekultivierung kryokonservierter Zellen**

Zur Rekultivierung wurde ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 8 ml zellspezifischem Medium (Tab. 7) bestückt. Nach Entnahme der Kryokonserven aus dem Stickstofftank oder dem  $-80^{\circ}\text{C}$  Tiefkühlschrank, erfolgte eine kurze Erwärmung im Wasserbad bis ca. 75% der Zellsuspension aufgetaut waren. Durch Zuführen von 1 ml Medium aus dem vorbereiteten 15 ml Reaktionsgefäß, taute die restliche Zellsuspension auf und konnte nach vorsichtigem Resuspendieren in das 15 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation (4 min, 250 g) pelletiert und der Überstand mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 6 ml zellspezifischem Medium gelöst und in einer  $25\text{ cm}^2$  Kulturflasche inkubiert. Abhängig vom Wachstum, frühestens jedoch nach 24 h, erfolgte die nächste Passage zur Expansion der Zellzahl auf eine  $75\text{ cm}^2$  Kulturflasche.



### **3.2.1.5 Herstellung von Zellpellets**

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und je nach Fläche des Zellkulturgefäßes mit 0,5 ml (Well einer 6-Wellplatte) bzw. 1 ml (25/ 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche) eiskaltem PBS versetzt. Da es für die nachfolgenden Experimente unerlässlich war die Adhäsionsmolekülstruktur der Zelloberfläche zu erhalten, wurden die adhärenen Zellen nicht enzymatisch, sondern auf Eis lagernd mit einem Zellschaber von ihrem Untergrund gelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C, für 20 min bei 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Sie dienten der Protein- und RNA-Analyse mittels Western Blot und PCR.

### **3.2.1.6 Zelllyse**

Zur Bestimmung der Proteinexpression in den einzelnen Zelllinien wurden die, aus der Zellkultur gewonnenen, Pellets lysiert. Zur Analyse der membranständigen Adhäsionsmoleküle ist es notwendig diese aus dem Membranverband der Zellen zu lösen. Dafür kamen in der vorliegenden Arbeit folgende Reagenzien im Lysepuffer zur Anwendung: ein Triton, Natriumdesoxycholat und SDS. Um eine Degeneration der Proteine zu verhindern wurde dem Lysepuffer der Proteinaseinhibitormix HP (Sigma Aldrich) hinzugefügt und auf Eis gearbeitet. Je nach Pelletgröße wurde die Menge an verwendetem RIPA-Puffer angepasst (für Knockdown Versuche aus 6-Wellplatten 50 µl) und die Zellpellets im Lyspuffer aufgenommen. Durch mehrfaches kräftiges Auf- und Abpipettieren und anschließender Inkubation auf einem Rotationssshaker wurden die Proben für 30 min bei 4°C lysiert. Im Anschluss erfolgte für 20 min eine Zentrifugation bei 4°C und 16000 g. Der Überstand ist das Lysat der Zellproteine. Er wurde vorsichtig abgenommen und in 0,5 ml Reaktionsgefäßen entweder auf Eis weiterverarbeitet oder bei -20°C aufbewahrt.

*RIPA-Lysepuffer:*        *NaCl 0,2 M, Natriumdesoxycholat 1%, Triton-X 100 1%, SDS 0,1%, Tris-HCl 0,05 M pH 7,5, EDTA 4 mM*

*Proteinaseinhibitor:*    *5 µl/ ml*

### **3.2.1.7 Lebendzellfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen**

Zur Differenzierung der Endothel- (HUVEC) und Trophoblastzellen (HTR-8/SVneo oder JEG-3) in den Kokulturen auf Matrigel® oder während der Durchflusszytometrie, wurden HUVEC-Zellen mit grünem und Trophoblastzellen mit rotem Fluoreszenzfarbstoff (*CellTracker™ Green CMFDA Dye* und *MitoTracker® Deep Red<sup>FM</sup>*, Invitrogen) gefärbt.

Hierfür wurden die Farbstoffe zunächst mit DMSO auf eine Konzentration von 10 mM gelöst. Je 1 ml serumfreiem Medium (Ham's F12) wurde 1 µl 10 mM Farbstofflösung zugesetzt und die Zellen für 30 min im Brutschrank gefärbt (6 Wellplatte je 1 ml, 25 cm 2 ml, 75 cm 5 ml). Im Anschluss wurde das Medium inklusive Farbstoff entfernt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Aufgrund des Zellstress durch die Färbeprozedur folgte für die Trophoblastzellen eine einstündige Inkubation in zellspezifischem Medium bevor sie für die Matrigel-Kokultur weiterverwendet wurden.

### **3.2.2 2D-Kokultur von Endothel- und Trophoblastzellen**

Als Kontrolle für einen erfolgreichen N-Cadherin-Knockdown mittels Durchflusszytometrie diente eine 2D-Kokultur von HUVEC- und HTR-8/SVneo-Zellen. Dafür wurden in vier 25cm<sup>2</sup> Kulturflaschen je 300 000 HUVEC-Zellen für 24 h im Brutschrank inkubiert. Parallel dazu wurden HTR-8/SVneo Zellen mit N-Cadherin spezifischer siRNA transfiziert oder als Kontrollen vorbereitet. Am folgenden Tag wurden zu jeder Kulturflasche HUVEC-Zellen 150 000 vorbehandelte HTR-8/SVneo-Zellen sowie ein Mediumgemisch aus 50% ECGM/ 50% RPMI mit 10% FKS zugesetzt. Die Kokultivierung betrug 24 h.

### **3.2.3 3D-Kokultur auf Matrigel®**

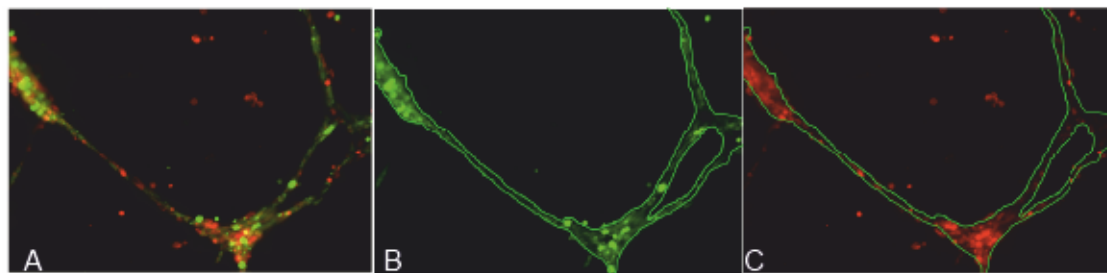
Als *in vitro* Modell für die dreidimensionale Umgebung, in welche die extravillösen Trophoblastzellen *in vivo* das maternale Gewebe infiltrieren, diente die Zellkultur auf *BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix*, kurz Matrigel®, der Firma BD Biosciences. Auf dieser Matrix können die Zellen auch in der Zellkultur dreidimensional wachsen und sich fortbewegen.

Nach Auftauen des Matrigels® bei 4°C wurden je 250 µl mittels gekühlter Pipettenspitzen (4°C) in die vier Kammern eines *BD Falcon™ Culture Slides* (BD Biosciences) gefüllt. Diese Arbeit wurde auf Kühllakus ausgeführt, um eine vorzeitige Gelierung des Matrigels® zu vermeiden. Im Anschluss erfolgte für 30 min bei 37°C das Aushärten des Gels in den Kammern. Durch Zugabe von 1 ml ECGM pro Kammer wurde das Gel über Nacht äquilibriert. Am folgenden Tag wurde das ECGM-Medium entfernt und 100 000 zuvor mit *CellTracker™ Green CMFDA Dye* gefärbten HUVEC-Zellen in 1 ml ECGM je Matrigel® aufgetragen. Die Inkubationszeit der HUVEC-Zellen im Brutschrank betrug 24 h und ermöglichte die Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes von kapillarartigen Röhren (Scherberich und Beretz 2000, Song et al. 2000). Am folgenden Tag wurde das Medium vorsichtig entfernt, die Gele mit 500 µl PBS gewaschen und erneut 500 µl ECGM in die Kammern gefüllt. Dies gelang unter Verwendung von Pasteur-Glaspipetten mit Gummisauger (Carl Roth GmbH). Von den zuvor mit siRNA behandelten und mit *MitoTracker® Deep Red<sup>FM</sup>* gefärbten HTR-8/SVneo-Zellen wurden 50 000 Zellen in 500 µl RPMI auf jeweils eine Kammer aufgetragen. Es folgte eine Kokultivierung beider Zelllinien für 24 h im Brutschrank. Anschließend wurde das Medium vorsichtig entfernt, die Kammern mit je 1ml PBS gewaschen und mit 1 ml eiskaltem Methanol-DMSO (4:1) für 24 h bei 4°C fixiert. Nach Entfernung des Fixans, wurde die Kammervorrichtung vom Objektträger gelöst und die Kokulturen auf Matrigel® mit je 2 Tropfen *VECTASHIELD® HardSet™ Mounting Medium* (Vector Laboratories Inc.) eingedeckt und lichtgeschützt aufbewahrt.

Die Fluoreszenzaufnahmen der fixierten Matrigel-Kokulturen erfolgten mit dem Epifluoreszenzmikroskop *AxioObserver Z1* der Firma Zeiss (10x Objektiv) und der dazugehörigen Software *AxioVision Imagingsoftware®*. Zur Bildaufnahme wurde mit Hilfe der „*AxioVision Imagingsoftware®*“ (Zeiss) ein Raster mit 10 Aufnahmepunkten pro Gel erstellt, welche automatisch im Präparat angefahren wurden. An diesen Stellen folgte das Aufsuchen und Fotografieren der nächstgelegenen Tubulivernetzung in 10facher Vergrößerung. Die Aufnahmen erfolgten durch einen verblindeten Untersucher.

### 3.2.4 Quantitative Analyse der Zellinteraktion

Die quantitative Analyse der Bilder gelang softwaregestützt über die interaktive Internetplattform der Firma *Wimasis Image Analysis*<sup>®</sup> mit einem für diese Anwendung entwickelten Algorithmus. Der Algorithmus ermittelt zunächst die grüne Fluoreszenz der Bilder (HUVEC-Netze), welche dann als Matrix verwendet wird. In der Analyse erfolgt die Bestimmung des Anteils der roten Fluoreszenz (Trophoblastzellen), die nicht an die grüne Matrix unmittelbar angrenzt oder mit ihr überlappt. Dieser Wert entspricht dem Anteil der Trophoblastzellen, die nicht mit den Endothelzelltubuli im Matrigel<sup>®</sup> interagieren (Abb. 7). Ein Prozentsatz wurde für jedes Bild einzeln ermittelt und anschließend der Mittelwert aus allen 10 Bildern berechnet.



**Abb. 7: Auswertungsalgorithmus der Matrigel<sup>®</sup>-Aufnahmen**

Aufnahme einer 3D-Kokultur auf Matrigel<sup>®</sup> (A). Auf Basis der grün fluoreszierenden Endothelzelltubuli und deren unmittelbare Umgebung wird eine Matrix entwickelt (B). Quantifiziert wird, wieviel Prozent der rot fluoreszierenden Trophoblastzellen (HTR-8/SVneo) keinen Kontakt zu der grünen Matrix hat (C).

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse der Matrigel<sup>®</sup>-Kokulturen nach Molekülmanipulation wurde mittels t-test im Excel-Programm von Windows errechnet. Dieses korreliert mit dem im SPSS-Programm. Hinzugezogen wurden die Mittelwerte jedes experimentellen Ansatzes. Analysiert wurde, ob der Knockdown der Adhäsionsmoleküle N-Cadherin, CD162 oder VCAM-1, im Vergleich zu der Transfektion mit non target siRNA, einen signifikanten Einfluss auf die Interaktion zwischen HUVEC- und HTR-8/SVneo-Zellen nimmt. Die Mittelwerte der Versuchsergebnisse wurden gepaart betrachtet (typ 1- d.h. Versuch 1 *non target* wurde mit Versuch 1 N-Cadherin Knockdown gepaart) und in beide Richtungen analysiert (tail 2- d.h. sowohl eine signifikante Erhöhung, sowie Verminderung der



Interaktion nach Knockdown wurde betrachtet). Ein Ergebnis von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

Die Analyse einer möglichen Veränderung des Interaktionsmusters von extravillösen HTR-8/SVneo-Zellen mit Endothelzelltubuli in einer Matrigel®-Kokultur nach Herabregulation eines Adhäsionsmoleküls erfolgte für jedes Membranprotein in mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Kontrollen aus zellspezifischem Medium (Kontrolle), reinem DharmaFECT (*no siRNA*) und unspezifischer siRNA (*non target*) wurden in den Versuchen mitgeführt. Zur Verifizierung des Protein-Knockdowns wurden parallel Kontrollen für die Proteinbestimmung mittels Western Blot geführt.

### **3.2.5 Stimulation der Adhäsionsmolekülexpression mit TNF- $\alpha$ und VEGF**

Alle Zelllinien wurden in jeweils drei 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 100% kultiviert. Nach Entfernen des Mediums und sorgfältigem Waschen mit PBS, wurden die Zellen für 1 h mit Ham's F12-Medium ohne FKS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals gewaschen. Für den Versuch wurden jeweils eine der drei 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit zellspezifischem Medium (Kontrolle) oder mit zellspezifischem Medium mit 5 ng/ ml TNF- $\alpha$  bzw. 20 ng/ ml VEGF über 24 h stimuliert. Abschließend wurden für die Analyse mittels Western Blot Zellpellets hergestellt.

### **3.2.6 Stimulation von Trophoblastzellen mittels Endothelial Cell Growth**

#### **Medium (ECGM) und HUVEC konditioniertem ECGM**

Für die Gewinnung von HUVEC-konditioniertem Medium wurde, 24 h vor Versuchsbeginn, eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit 100% konfluenten HUVEC-Zellen mit neuem ECGM (14 ml) versetzt, welches am darauf folgenden Tag für die Stimulation verwendet wurde.

Trophoblastzellen der einzelnen Zelllinien wurden zu 100 000 Zellen pro Well auf 6-Wellplatten inkubiert. Bei Stimulation wiesen alle Wells eine Konfluenz von 60-



70% auf. Vor Beginn der Stimulation wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und diese für 1 h mit Ham's F12-Medium ohne FKS inkubiert. Im Anschluss wurde das serumfreie Medium entfernt und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Die Stimulation erfolgte jeweils für 6 und 24 h mit zellspezifischem Medium (Kontrolle), ECGM oder HUVEC-konditioniertem Medium. Abschließend wurden die Zellen pelletiert.

### 3.2.7 Suppression der Adhäsionsmolekülexpression durch siRNA vermittelten Knockdown

Die Suppression einzelner Adhäsionsmoleküle gelang durch die Transfektion mit siRNA nach einer Inkubationszeit von 24, 48 oder 72 h. Zur Anwendung kamen die DharmaFECT® siRNA-Transfektions-Reagenzien und die spezifischen *ON-TARGETplus* siRNAs für N-Cadherin, CD162 und VCAM-1 von Thermo Fisher Scientific gemäß Herstellerangaben. Alle Knockdown Versuche wurden in HTR-8/SVneo-Zellen durchgeführt.

Als Vorbereitung für die Transfektion wurden HTR-8/SVneo-Zellen mit einer Zellzahl von 100 000 Zellen pro Well auf einer 6-Wellplatte für 24 h inkubiert (Konfluenz 70-80%). Nach Entfernen des Mediums und Waschen mit PBS wurden die Zellen mit a) zellspezifischem Medium, b) siRNA-freiem DharmaFECT®, c) unspezifischer *non target* siRNA oder d) spezifischen *ON-TARGETplus* siRNAs für N-Cadherin, CD162 oder VCAM-1 inkubiert (Tab. 8 und 9). Die Medien/Reagenzien a) bis c) dienten als Kontrolle, um die erfolgreiche Suppression des spezifischen Proteins überprüfen zu können.

Alle siRNA-Lösungen wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll mit RNase-freiem, 1x siRNA-Puffer auf 2 µM verdünnt. Sowohl die *non target* als auch die spezifischen siRNAs wurden mit einer finalen Konzentration von 20 nM pro Well verwendet. Während der Etablierung des CD162-Knockdowns wurden zusätzlich finale siRNA-Konzentrationen von 50 nM und 100 nM getestet (Tab. 3.7).

Nach einer Transfektionszeit von 24 h wurde je Well 1 ml zellspezifisches Medium zugegeben. Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen nach 24, 48 oder 72 h auf eine 3D-Kokultur auf Matrigel® übertragen oder der Proteinanalyse zugeführt.

**Tab. 8: Pipettierschema für den Knockdown der spezifischen Adhäsionsmoleküle bzw. deren Kontrollen**

Die *non target* und spezifischen siRNAs wurden mit einer Ausgangslösung von 2  $\mu$ M und damit einer finalen Konzentration von 20 nM pro Well verwendet. Die Medien/ Reagenzien a) bis c) dienen als Kontrolle.

	2 $\mu$ M siRNA- Lösung ( $\mu$ l)	DharmaFECT®- Transfektions- reagenz ( $\mu$ l)	zellspezifisches Medium ohne FKS ( $\mu$ l)	zellspezifisches Medium mit FKS ( $\mu$ l)
a) zellspezifisches Medium	/	/	/	1000 $\mu$ l
b) siRNA-freies DharmaFECT®	/	2 $\mu$ l	198 $\mu$ l	800 $\mu$ l
c) <i>non target</i> siRNA	10 $\mu$ l	2 $\mu$ l	188 $\mu$ l	800 $\mu$ l
d) <i>ON-TARGETplus</i> siRNAs für N-Cadherin, CD162 oder VCAM	10 $\mu$ l	2 $\mu$ l	188 $\mu$ l	800 $\mu$ l

**Tab. 9: siRNA-Konzentrationen für der Etablierung des CD162-Knockdowns**

Für die Etablierung des CD162-Knockdowns wurden steigende Konzentrationen spezifischer siRNA eingesetzt. Die Kontrollen blieben unverändert und sind Tab. 3.6. zu entnehmen.

	Finale Konzentration der siRNA- Lösung (nM)	2 $\mu$ M siRNA- Lösung ( $\mu$ l)	DharmaFECT®- Transfektions- reagenz ( $\mu$ l)	Zellspezifisches Medium ohne FKS ( $\mu$ l)	Zellspezifisches Medium mit FKS ( $\mu$ l)
<i>ON-TARGETplus</i> siRNAs für CD162	20 nM	10 $\mu$ l	2 $\mu$ l	188 $\mu$ l	800 $\mu$ l
	50 nM	25 $\mu$ l	3 $\mu$ l	172 $\mu$ l	800 $\mu$ l
	100 nM	50 $\mu$ l	4 $\mu$ l	146 $\mu$ l	800 $\mu$ l

### 3.2.8 Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot

#### 3.2.8.1 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mit Hilfe des *Pierce™ BCA Protein Assay Kits* der Firma Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben ermittelt. BSA-Standards wurden in RIPA-Lysepuffer mit einer Endkonzentration von 0 bis 2000  $\mu$ g/ ml hergestellt. Die Analyse erfolgte nach dem modifizierten Protokoll zur Anwendung in Mikrotiterplatten mit einem Volumen von 10  $\mu$ l. Lysate wurden bei Bedarf im Verhältnis 1:2 oder 1:4 mit RIPA-Lysepuffer verdünnt. Die optische Dichte der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm im UV/Vis-Absorptionsspektrometer (BMG Labtech GmbH) gemessen und die Proteinkonzentrationen mit der Hilfe der *MARS Data Analysis Software* (BMG Labtech GmbH) und der ermittelten Standardkurve berechnet.

### 3.2.8.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Vor Gebrauch wurden alle Materialien sorgfältig mit 70% Ethanol gereinigt. Für die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden 7,5%ige Trenngele sowie 4%ige Sammelgele hergestellt. Nach Auspolymerisierung der Gele wurden die Geltaschen durch Spülen mit destilliertem Wasser von Acrylamidresten befreit und der Laufpuffer in die vertikale Elektrophoresekammer gefüllt.

Die Lysate, mit einer in Tabelle 7 aufgeführten Proteinmenge, wurden mit 1/5 Vol. 6x Probenpuffer versehen, bei 95°C 5 min denaturiert und kurz abzentrifugiert. Nach dem Befüllen der Geltaschen mit den Proben und 6 µl Proteingrößenstandard (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH), erfolgte die spannungskontrollierte Elektrophorese für 2 h bei konstant 75 V pro Gel.

<i>Trenngel (7,5%, 10ml):</i>	Methylenbisacrylamid (30%) 2,5 ml, TGP 1,9 ml, SDS (20%) 50 µl, ddH <sub>2</sub> O 5,6 ml, APS (20%) 40 µl, TEMED 4 µl
<i>Sammelgel (4%, 5ml):</i>	Methylenbisacrylamid (30%) 0,66 ml, SGP 1,25 ml, SDS (20%) 25 µl, ddH <sub>2</sub> O 3,1 ml, APS (20%) 40 µl, TEMED 4 µl
<i>Trenngelpuffer (TGP):</i>	Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8
<i>Sammelgelpuffer (SGP):</i>	Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8
<i>6x Probenpuffer:</i>	Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) 7,0 ml, Glycerin 3,0 ml, SDS 10%, DTT 0,6 M, eine Spatelspitze Bromphenolblau
<i>10x Laufpuffer:</i>	Glycin 2 M, Tris-HCl 250 mM, SDS 1%
<i>1x Laufpuffer:</i>	100 ml 10x Laufpuffer/ 1 l ddH <sub>2</sub> O

### 3.2.8.3 Semi-Dry Western Blot

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel 10-15 min in Transferpuffer gewaschen. Die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Transfermembran wurde kongruent der Gelgröße zurechtgeschnitten, 30 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Die Beschichtung auf der Anode der Blotkammer erfolgte in folgender Reihenfolge: drei Lagen in Transferpuffer getränkte Filterpapiere, PVDF-Transfermembran, Gel und abschließend drei weitere Lagen in Transferpuffer getränkte Filterpapiere. Mögliche Luftblasen zwischen den Schichten wurden durch Ausrollen entfernt und der Deckel der Blotkammer (Kathode) aufgelegt. Bei einer

Stromstärke von 1 mA/ cm<sup>2</sup> Gel und einer Blotzeit von 1 h wurden die aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Membran transferiert. Die Übertragung des gesamten Proteingrößenstandards auf die PVDF-Membran diente als Nachweis für einen erfolgreichen Proteintransfer.

*Transferpuffer:* Tris-HCl 48 mM, Glycin 39 mM, SDS 0,037%, Methanol 15%

#### **3.2.8.4 Immunodetektion**

Vor Beginn der Immunodetektion wurden die Membranen an der 70kDa Markierung durchtrennt, was die Detektion von Adhäsionsmolekülen auf der oberen Membranhälfte sowie des Referenzproteins  $\alpha$ -Tubulin auf der unteren Membranhälfte ermöglichte. Für die Analyse von VCAM-1 wurden die Membranen nicht getrennt, sondern nach der ersten VCAM-1-Detektion „gestrippt“ und erneut mit Anti- $\alpha$ -Tubulin inkubiert.

Um ein unspezifisches Binden der Antikörper an die Proteine zu verhindern wurde die PVDF-Membran 30 min in 5% Milch-Blocklösung geschwenkt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran mit dem, in 5% Milch-Blocklösung gelösten Primärantikörper (Tab. 10) über Nacht bei 4°C unter Schwenken. Nach Entfernung der Antikörperlösung wurde die Membran 3x für 10 min mit TBS-Tween20 gewaschen und anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit, ebenfalls in 5% Milch-Blocklösung gelösten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Tab. 10) inkubiert. Um ungebundene Antikörperreste zu eliminieren erfolgte das Waschen der Membran mit TBS-Tween20 (3x 10 min).

Zur Detektion der Proteine wurde die Membran mit Luminolsubstrat (*Luminata Forte Western HRP Substrat*, Merck Millipore) benetzt und anschließend zwischen zwei Folien gelegt. Die Darstellung und Bearbeitung der Chemolumineszenzsignale erfolgte durch das Bildanalysesystem MF-ChemiBIS 3.2 und der dazugehörigen *GelCapture-Software* (Version 5.1, DNR Bio-Imaging-Systems). Nach der Proteindetektion wurde die Membran nochmals in TBS-Tween20 gewaschen und in einer luftdicht zugeschweißten Folie bei 4°C dauerhaft aufbewahrt.

*10x TBS:* Tris-HCl 248 mM, NaCl 1,37 M pH 7,6

*1x TBS:* 100 ml 10x TBS/ 1 l ddH<sub>2</sub>O



*1x TBS-Tween:* Tween20 0,1%, TBS 1x

*Milch-Blocklösung:* Milchpulver 5%, TBS-Tween (1x)

**Tab. 10: Übersicht der verwendeten Antikörper für die Immunodetektion**

Aufgeführt sind alle adhäsionsmolekülspezifischen Primärantikörper, der Primärantikörper des Referenzproteins  $\alpha$ -Tubulin und alle HRP-konjugierten Sekundärantikörper (*HRP-horseradish peroxidase*) mit den jeweils verwendeten Verdünnungen. Zusätzlich die, in der Elektrophorese aufgetragenen Proteinmengen pro Kammer.

Antigen	Proteinmenge pro Geltasche	Verdünnungsverhältnis	Wirtsspezifität des Antikörpers	Bezugsquelle, Klon
N-Cadherin	20 $\mu$ g	1:200	Monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich (C2542), GC-4
E-Cadherin	10 $\mu$ g	1:1000	Monoklonal, Hase	BD Biosciences (610181), 36/E-Cadherin
VE-Cadherin	20 $\mu$ g	1:100	Polyklonal, Hase	Samta Cruz Biotech (sc-28644)
VCAM-1	20 $\mu$ g	1:500	Monoklonal, Maus	Abcam (ab98954), 6 G9
VLA-4	40 $\mu$ g	1:100	Polyklonal, Hase	Abcam (ab76975)
CD162	20 $\mu$ g	1:250	Polyklonal, Hase	Abcam (ab66882)
P-Selektin	50 $\mu$ g	1:100	Polyklonal, Ziege	Santa Cruz Biotech (sc-6953)
$\alpha$ -Tubulin	variierend	1:10000	Monoklonal, Maus	Abcam (ab7291-100), DM1A
Maus (HRP konjugiert)	-	1:1000	-	Cell Signaling (7076)
Hase (HRP konjugiert)	-	1:1000	-	Cell Signaling (7074S)
Ziege (DyLight 649)		1:1000	Polyklonal, Esel	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (705-495-147)

### 3.2.8.5 Entfernung gebundener Antikörper von der Blotmembran (Stripping)

Zur Detektion eines weiteren Proteins auf einer Blotmembran mussten die zuvor gebundenen Antikörper von der Membran gelöst werden. Dafür wurde die PVDF-Membran 30 min bei Raumtemperatur in Stripp-Puffer geschwenkt und anschließend gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen, um Rückstände von  $\beta$ -Mercaptoethanol vollständig zu entfernen. Nach erneuter Blockierung der Membran konnte diese für eine weitere immunochemische Untersuchung verwendet werden.

*Stripp-Puffer:* Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2%,  $\beta$ -Mercaptoethanol 100 mM



### 3.2.9 Analyse der Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie

Anhand der Durchflusszytometrie ist eine Analyse von membrangebundenen und intrazellulären Molekülen, sowie die Sortierung von heterogenen Zellgruppen (*fluorescence activated cell sorting*; FACS) möglich. Mittels *sorting* werden Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und unterschiedlichen Fluoreszenz unterschieden und separatisiert. Der Nachweis von Proteinexpression im FACS erfolgt nach proteinspezifischer Antikörperbindung und Markierung der Antikörperbindung mittels fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper. Zum Nachweis membranständiger Proteine ist eine, die Membranbindung erhaltende, Lösung der Zellen von der Zellkulturschale notwendig. Die Verwendung von kalziumbindendem EDTA verbietet sich insbesondere bei beabsichtigtem Nachweis der kalziumabhängigen Cadherine. Die Lösung der adhären Zellen erfolgte deshalb mittels Accutase für 7 min bei 37°C vom Kulturflaschen- oder Wellboden. Dieser Prozess wurde sehr schonend durchgeführt, um die Zerstörung der Adhäsionsmoleküle während des Lösungsprozesses nochmals zu minimieren. Nach der Ablösung erfolgte die Resuspension der Zellen in zellspezifischem Medium und ggf. die Bestimmung der Zellzahl. Nachfolgend wurde die Zellsuspension bei 200 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Zur Bestimmung der Proteinexpression wurden die Zellen mit 200 µl Primärantikörper (Tab. 11), gelöst in 2% BSA/ PBS, resuspendiert und bei 4°C für 45 min unter Lichtausschluss auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 200 g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 200 µl, in 2% BSA/ PBS gelösten, fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper resuspendiert. Nach Inkubation bei 4°C für 30 min unter Lichtausschluss auf einem Schüttler, wurden die Zellen erneut bei 4°C und 200 g für 5 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes folgte ein Waschschriff, um überschüssige Antikörper und damit überschüssige Fluoreszenz zu beseitigen. Hierzu wurden die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert und bei 4°C und 200 g für 5 min zentrifugiert. Für die Analyse wurden die Zellen erneut in 500 µl PBS resuspendiert. Als Kontrolle für eine mögliche unspezifische Antikörperbindung und zur Einstellung der Messparameter diente die IgG-Isotypkontrolle (Tab. 11).

Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Proben wurden pro Versuchsansatz 10 000 Zellen analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software „*CellQuest Pro*“ der Firma BD Biosciences.

**Tab. 11: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie**

Der N-Cadherin-Primärantikörper sowie die IgG-Isotypenkontrolle wurden mit dem fluoreszenzmarkierten GAMDL 649-Sekundärantikörper gekoppelt.

Antigen	Klon	Verdünnungsverhältnis	Wirtsspezifität des Antikörpers	Bezugsquelle
N-Cadherin	GC-4	1:100	Monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich C2542
IgG	-	1:50	Monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich
GAMDL 649	-	1:250	Anti-Maus	Jackson Immunoresearch

### 3.2.10 Analyse der Gene mittels PCR

#### 3.2.10.1 Isolation von Gesamt-RNA

Zur Bestimmung der Genexpression der selektierten Adhäsionsmoleküle wurde die Gesamt-RNA aus den gewonnenen Zellpellets isoliert. Für die RNA-Isolation wurde der *innuPrep RNA Mini Kit* kombiniert mit dem *innuPREP DNase I digest kit* der Firma Analytik Jena gemäß Herstellerangaben verwendet. Im Anschluss erfolgte die photospektrometrische Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA mit dem NanoDrop-1000 bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm.

#### 3.2.10.2 cDNA-Synthese

Um die Expression der spezifischen mRNA zu detektieren war es notwendig, die extrahierte Gesamt-RNA zunächst mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umzuschreiben. Die cDNA-Synthese erfolgte pro Transkriptionsreaktion aus 500 ng (CD162, VLA-4) oder 200 ng (N-Cadherin, VCAM-1) der gewonnenen RNA, Oligo-dT-Primern (Sigma-Aldrich), dNTP's (Desoxyribonukleosid-triphosphate), *Ribolock RNase Inhibitor* und der *Maxima Reverse Transcriptase* von Thermo Fisher Scientific gemäß Herstellerangaben. Non-template-Kontrollen und Kontrollen ohne Reverse Transkriptase (RT-) wurden mitgeführt, um Kontaminationen der Reagenzien oder der Gesamt-RNA mit genomischer DNA auszuschließen.

### 2.2.9.3 PCR

Aus der cDNA wurde, unter Einsatz von genspezifischen Primern in der PCR (Tab. 12), die spezifische mRNA synthetisiert und anschließend quantifiziert. Die PCR erfolgte mit dem *Mastercycler ep gradient S* (Eppendorf) unter Verwendung der *Dream-Taq DNA Polymerase* und dem dazugehörigen Puffer sowie dNTP's der Firma Thermo Fisher Scientific. Die Endpunkt-PCR wurde im 10 µl Ansatz nach Tabelle 13 mit dem in Tabelle 14 beschriebenen Programm durchgeführt.

**Tab. 12: Primer Sequenzen**

Name	Forward Sequenz 5'→3'	Reverse Sequenz 5'→3'
CD162	GGTCCCTCTAACATCTCCCA	CACTCTTCAGTACTCCTCCCT
VLA-4	GCAATGGAAACAAACCTCGT	GATAGCAACATCTTCAAAGCCA
N-Cadherin	CCTGCGCGTGAAGGTTTGCC	TCTTGAACCGTGGCCCCCAG
VCAM-1	TGAGTGGCCCTCTGGAGGCT	GCCGGTCAAGGGGGTACACG

**Tab. 13: Zusammensetzung der Reagenzien für einen 10 µl PCR-Ansatz.**

Reagenz	Stammkonzentration	Volumen 1x	Endkonzentration
Dream-Taq PCR Puffer	10x	1,0 µl	1x
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1,25 mM	1,6 µl	0,2 mM
Dream-Taq DNA Polymerase	5 U/ µl	0,1 µl	0,5 U
Nuklease-freies Wasser	-	5,3 µl	-
Template (cDNA oder RT(-)-Kontrolle)	-	1,0 µl	-
Primer forward	10 µM	0,6 µl	0,6 µM
Primer revers	10 µM	0,6 µl	0,6 µM

**Tab. 14: Temperaturprogramm für die PCR**

Prozess	Temperatur in °C	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	2 min	} 40 Zyklen
Annealing	60°C	20 sec	
Elongation	72°C	20 sec	
Abschließende Elongation	72°C	2 min	
Kühlung	4°C	∞	

#### 3.2.10.3 Quantifizierung der PCR Produkte mittels Agarosegelelektrophorese

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit 1/5 Vol. *6x Orange DNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific) versetzt und auf 2% Agarosegele, welche mit 1x TAE-Puffer (Carl Roth GmbH & Co) und dem Farbstoff *RedSafe Nucleic Acid Staining Solution* (1x) angesetzt wurden, geladen. Als Größenstandard wurde der *O'GeneRuler*

*50bp DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte spannungskonstant entweder bei 120 V (CD162, VLA-4) oder 90 V (N-Cadherin, VCAM-1) in einer, mit 1x TAE-Puffer gefüllten, horizontalen Elektrophoresekammer für 60 (CD162, VLA-4) bzw. 90 min (N-Cadherin, VCAM-1). Der, dem Gel zugegebene, Farbstoff interkalierte während der Elektrophorese mit dem DNA-Doppelstrang der PCR-Produkte und konnte durch UV-Licht angeregt und visualisiert werden. Als Detektionssystem wurde der MF-ChemiBIS 3.2 und die dazugehörige *GelCapture-Software*<sup>®</sup> (Version 5.1) der Firma Biostep verwendet.

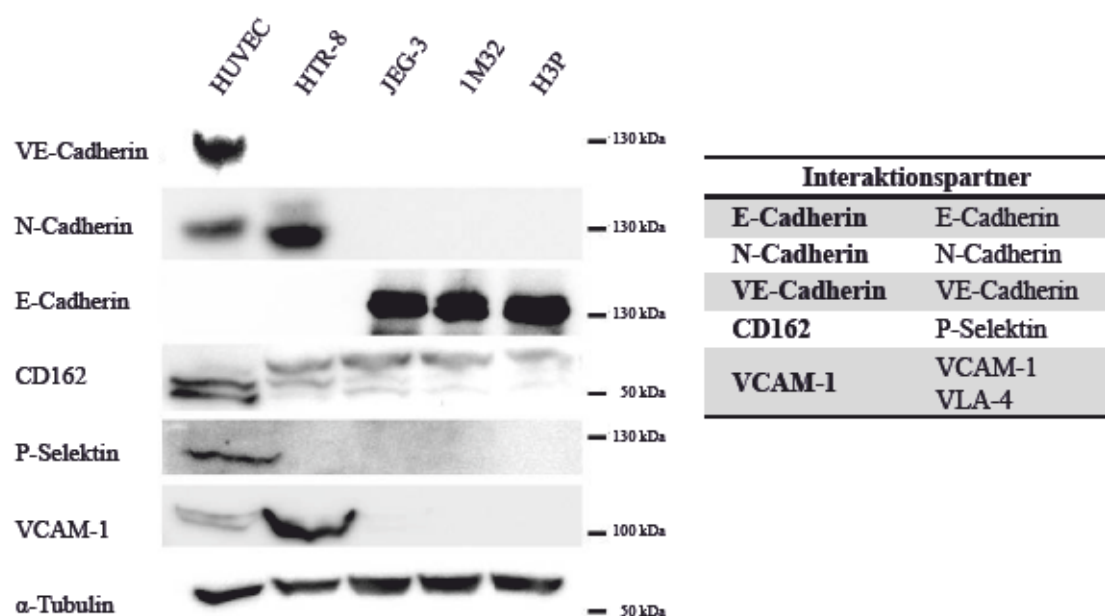
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Differentielle Expression der Adhäsionsmoleküle in den untersuchten Trophoblastzelllinien

#### 4.1.1 Expression der Adhäsionsmoleküle in HTR-8/SVneo-, JEG-3-, AC-1M32, AC-H3P- und HUVEC-Zellen

Nach einer Reihe von Optimierungen hinsichtlich des verwendeten Lysepuffers, der Blotbedingungen, der Pufferzusammensetzungen und der verwendeten Antikörper konnte der Western Blot für N-Cadherin, VE-Cadherin, E-Cadherin, CD162, VCAM-1 und P-Selektin erfolgreich etabliert werden. Der Nachweis von VLA-4 blieb mittels Western Blot erfolglos. Als Kontrolle für die Menge an geladenem Protein diente der Nachweis von  $\alpha$ -Tubulin. Es wurden jeweils mindestens zwei unabhängige Expressionsanalysen mittels Western Blot unter Verwendung von, in unterschiedlichen Experimenten gewonnenen, Zellpellets durchgeführt. Die folgende Abbildung zeigt die Zusammenstellung der Ergebnisse der Proteinexpression der einzelnen Zelllinien. Entsprechend zur Genexpressionsanalyse zeigte sich die Expression von N-Cadherin nur in HTR-8/SVneo und HUVEC-Zellen. P-Selektin konnte nur in HUVEC, sein Ligand CD162 in größter Menge in HTR-8/SVneo-Zellen nachgewiesen werden. Gleiche Expressionsmuster zeigten sich für VCAM-1: eine starke Expression in HTR-8/SVneo- und HUVEC-Zellen, dagegen eine kaum nachweisbare Expression in JEG-3, AC-1M32 und AC-H3P-Zellen. E-Cadherin und VE-Cadherin konnten auch in der Proteinexpressionsanalyse mittels Western Blot als Kandidaten für die Vermittlung einer spezifischen Interaktion zwischen HTR-8/SVneo und HUVEC ausgeschlossen werden.



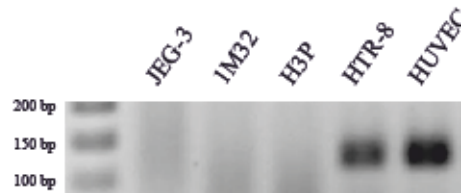


**Abb. 8: Expression der selektierten Adhäsionsmoleküle in allen untersuchten Zelllinien**

Expressionsanalyse von VE-Cadherin, N-Cadherin, E-Cadherin, CD162/P-Selektin und VCAM-1 anhand immunochemischer Detektion nach SDS-Gelelektrophorese und Western Blot in HUVEC-, HTR-8/SVneo-, JEG-3-, AC-1M32- und AC-H3P-Zellen. Als Ladekontrolle gleicher Proteinnengen diente  $\alpha$ -Tubulin. Proteinkonzentrationen und verwendete Antikörper sind Tab. 9 zu entnehmen. Als Mediatoren der spezifischen Interaktion zwischen HTR-8/SVneo-Zellen ließen sich N-Cadherin, CD162/P-Selektin und VCAM-1 bestätigen.

#### 4.1.2 Genexpression des VCAM-1 Liganden VLA-4 in HTR-8/SVneo-, JEG-3-, AC-1M32-, AC-H3P- und HUVEC-Zellen

VLA-4 (*very late antigen-4*), auch Integrin  $\alpha 4 \beta 1$  genannt, ist ein Integrindimer welcher unter anderem als Rezeptor für VCAM-1 agiert. Der Nachweis des VLA-4-Moleküls konnte im Western Blot nicht erfolgreich etabliert werden. Mittels PCR konnte die Genexpression der VLA-4- Untereinheit ITGA-4 in HTR-8/Svneo- und HUVEC-Zellen, nicht aber in den übrigen Trophoblastzelllinien, gezeigt werden (Abb.9). Eine selektive Interaktion von VLA-4 und VCAM-1 für HTR-8/SVneo- und HUVEC- Zellen ist demnach möglich.

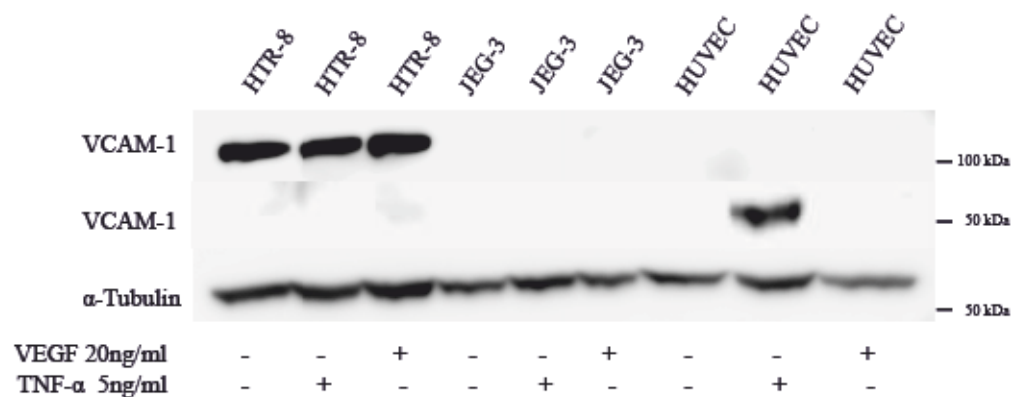


**Abb. 9: cDNA Nachweis von ITGA-4, Untereinheit des VLA-4 Rezeptors**

Darstellung der PCR-Amplifikate nach Agarosegelelektrophorese mit jeweils 1  $\mu$ l cDNA, welche aus 1  $\mu$ g RNA der einzelnen Zelllinien isoliert wurde. Die erwartete Amplifikatgröße ist 107 bp. ITGA-4 wird nur von HUVEC- und HTR-8/Svneo-Zellen transkribiert.

#### 4.1.3 VCAM-1 Expression nach Stimulation mit Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)

Nach Stimulation der Zellen mit 5 ng/ml TNF- $\alpha$  für 24 h zeigt sich eine Erhöhung der VCAM-1 Synthese in HUVEC-Zellen (Abb. 10). In den Zelllinien JEG-3, AC-1M32 oder AC-H3P konnte auch nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  eine Expression von VCAM-1 nicht nachgewiesen werden (Daten für AC-1M32 und AC-H3P nicht gezeigt). Nach Stimulation mit 20 ng/ml VEGF für 24 h zeigte sich keine Zunahme der VCAM-1 Expression (Daten für AC-1M32 und AC-H3P nicht gezeigt).



**Abb. 10: VCAM-1-Expression nach Stimulation mit 5 ng/ml TNF- $\alpha$  oder 20 ng/ml VEGF**

Immunochemische Detektion von VCAM-1 nach SDS-Gelelektrophorese und Western Blot in HTR-8/SVneo-, JEG-3- und HUVEC-Zellen. Als Ladekontrolle gleicher Proteinmengen diente  $\alpha$ -Tubulin. Die Proteinmenge pro Kammer betrug 20  $\mu$ g. Nach 24 h Zellstimulation mittels VEGF ließ sich keine Veränderung der VCAM-1-Expression auf den Zellen zeigen. 24 h nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  war die Expression von VCAM-1 in HUVEC-Zellen deutlich erhöht.

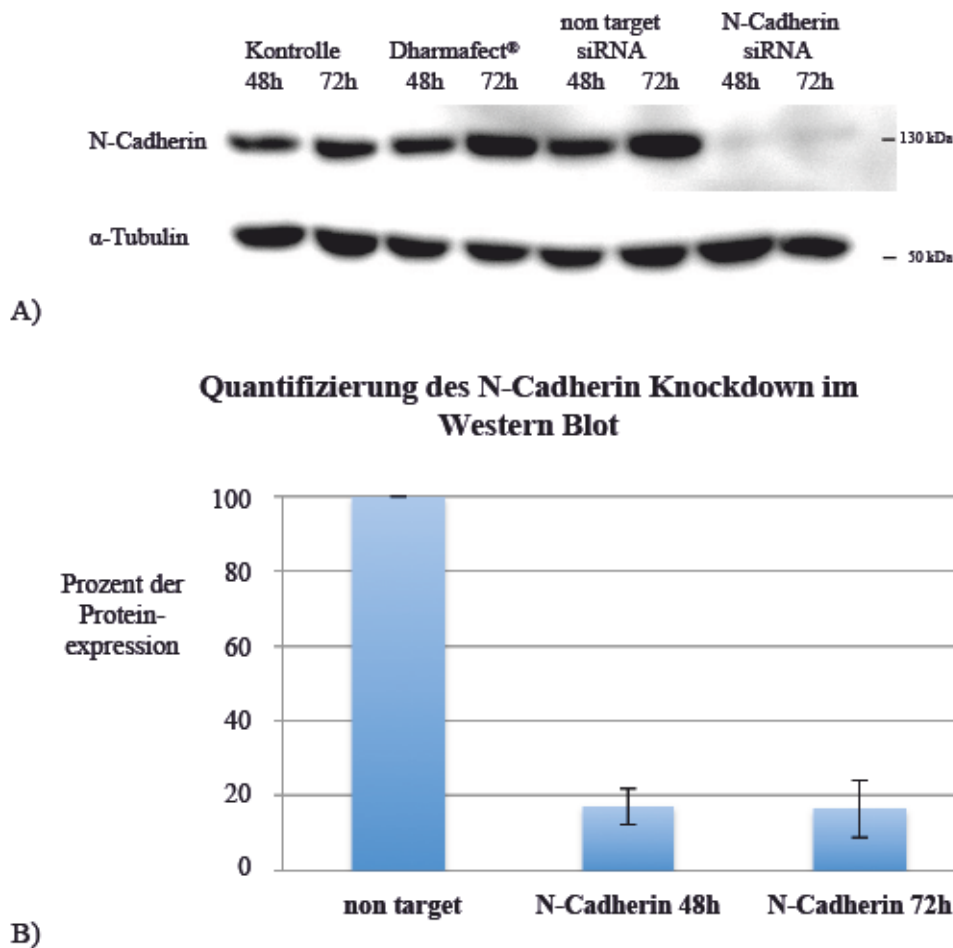
#### **4.1.4 Adhäsionsmolekülexpression in Trophoblastzellen nach Stimulation mit HUVEC-Medium (ECGM) oder mit, von HUVEC-Zellen, konditioniertem Medium**

Um zu untersuchen ob das Medium der HUVEC-Zellen (*Endothelial Cell Growth Medium*) oder Ausscheidungsprodukte der HUVEC-Zellen eine Veränderung in der Membranproteinexpression der Trophoblastzelllinien während einer Kokultur hervorrufen, wurden diese mit ECGM und durch HUVEC konditioniertes ECGM inkubiert. Es zeigte sich keine Veränderung der Expression von E-Cadherin, N-Cadherin, oder VCAM-1 (Daten nicht dargestellt). Für CD162 ergaben sich inkonstante Ergebnisse. Zunächst zeigte sich in der Western Blot Analyse nach Stimulation mit HUVEC Medium (6h) und HUVEC konditioniertem ECGM (24h) eine Zunahme der Expression von CD162. Diese ließ sich jedoch in den folgenden zwei Kontrollversuchen nicht reproduzieren (Daten nicht gezeigt). Weder das ECGM noch die freigesetzten Ausscheidungsprodukte der HUVEC Zellen scheinen demnach einen signifikanten Einfluss auf die Expression von N-Cadherin, E-Cadherin, CD-162 oder VCAM-1 in den Trophoblastzellen zu haben.

## **4.2 Spezifische Expressionsunterdrückung (Knockdown) der selektierten Adhäsionsmoleküle mittels kleiner Interferenz-ribonukleinsäuren (siRNA)**

### **4.2.1 Knockdown von N-Cadherin**

Der Knockdown von N-Cadherin in der extravillösen Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo konnte mit einer siRNA Menge von 20 nM und 2 µl DharmaFECT® pro Well (9,6 cm<sup>2</sup>) bei einer Zellkonfluenz von 80-90% erfolgreich etabliert werden. Abbildung 11A zeigt mittels Western Blot den fast vollständigen Knockdown des Proteins 48 h und 72 h nach siRNA Transfektion. Unter Verwendung von *Alpha View*® von *Cell Biosciences* wurde der Grad der Proteinsuppression quantifiziert (Abb. 11B). Der Western Blot wurde fortan als Kontrolle für eine erfolgreiche Proteinsuppression in den Matrigel®-Kokultur Versuchen genutzt.

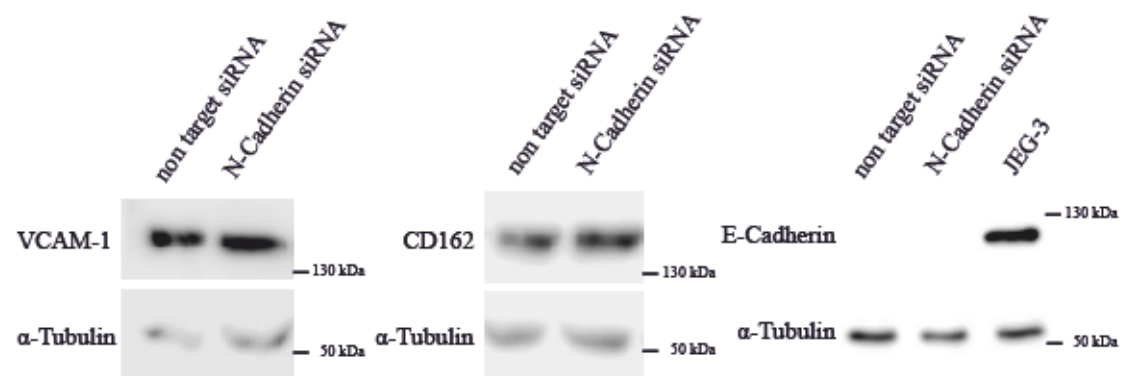


**Abb. 11: Kontrolle des N-Cadherin-Knockdowns in HTR-8/SVneo-Zellen mittels Western-Blot**

A) Immunochemische Detektion von N-Cadherin nach SDS-Gelelektrophorese und Western Blot in HTR-8/SVneo-Zellen. Die aufgetragene Proteinmenge pro Kammer betrug 20 µg, als zusätzliche Ladekontrolle gleicher Proteinmengen diente α-Tubulin. Ein erfolgreicher Knockdown ist nach 48 und 72 h siRNA-Inkubation nachweisbar. Die Kontrollen (Medium, DharmaFECT®, *non target* siRNA) zeigen keine relevanten Veränderungen der Proteinexpression. B) Balkendiagramm der Quantifizierung des N-Cadherin-Knockdowns im Western Blot mittels *Alpha View*® von *Cell Biosciences* (5 unabhängige Versuchsreihen). Nach 48 h siRNA Transfektion besteht ein Knockdown von 83%, nach 72 h von 84%. Die senkrechte Klammer gibt den Standarderror an.

Nach Etablierung der Molekülsuppression erfolgte die Spezifitätskontrolle des Knockdowns. Hierfür wurde die Expression der übrigen Adhäsionsmoleküle in den, mit N-Cadherin spezifischer siRNA, transfizierten Zellen untersucht. Wie in

Abbildung 12 dargestellt, zeigte sich mittels Western Blot keine Veränderung deren Expression nach Manipulation der N-Cadherinsynthese.

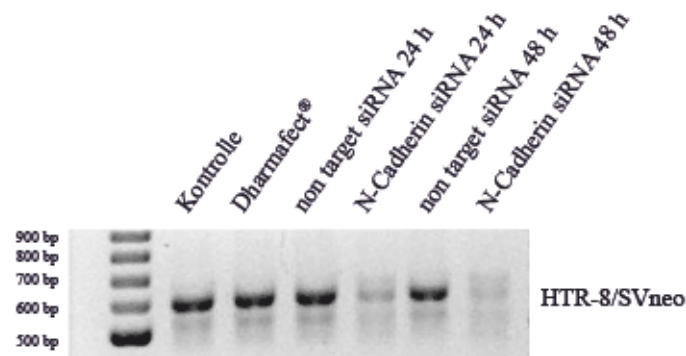


**Abb. 12: Spezifitätsanalyse der N-Cadherin siRNA**

Immunochemische Detektion in Folge von SDS-Gelelektrophorese und Western Blot in HTR-8/SVneo-Zellen 48 h nach unspezifischer *non target* oder spezifischer N-Cadherin siRNA Transfektion. Die Expressionen von E-Cadherin, VCAM-1 und CD162 in HTR-8/SVneo-Zellen zeigten nach N-Cadherin-Knockdown keine Veränderungen. Bei der Darstellung von E-Cadherin fungierte JEG-3 als Positivkontrolle. Als Ladekontrolle gleicher Proteinmengen diente  $\alpha$ -Tubulin. Proteinkonzentrationen und verwendete Antikörper sind Tab. 9 zu entnehmen.

Auch auf RNA-Ebene ließ sich nach Knockdown, mittels PCR, die Herabregulation der Genexpression von N-Cadherin in zwei separaten Versuchsansätzen bestätigen (Abb. 13).

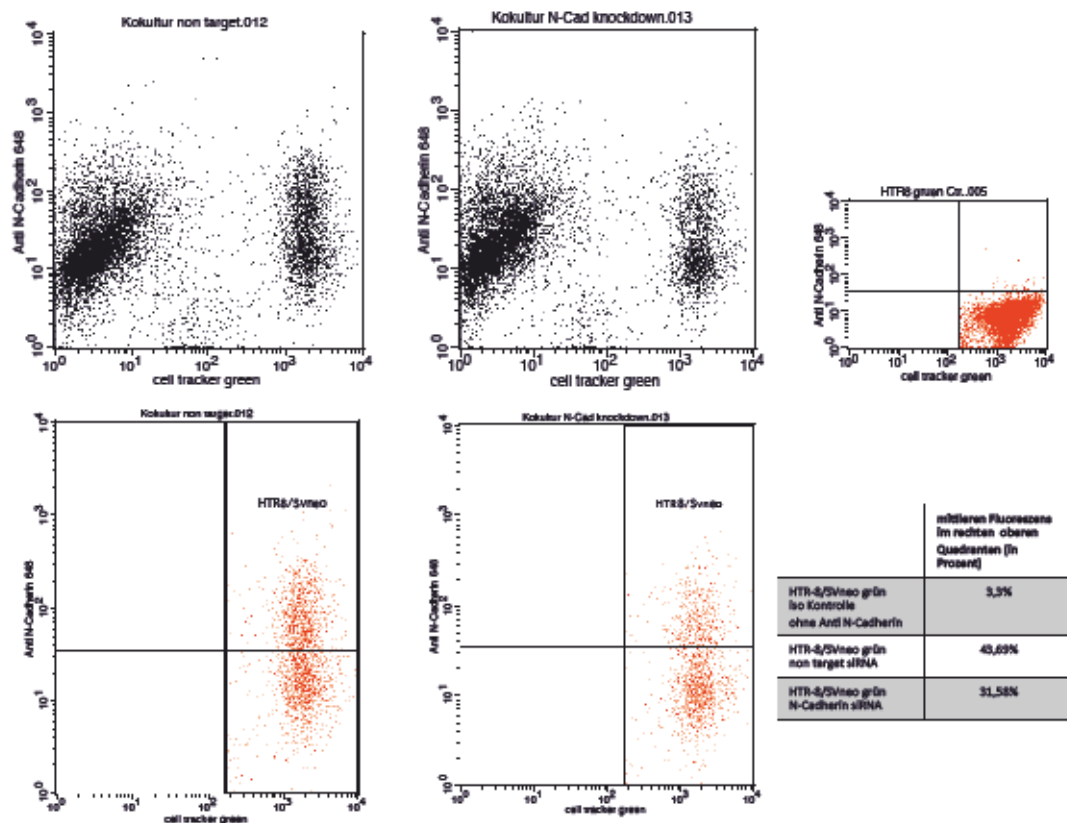




**Abb. 13: cDNA Nachweis von N-Cadherin nach Protein-Knockdown in HTR-8/SVneo-Zellen**

Dargestellt sind die PCR-Amplifikate von N-Cadherin cDNA nach Agarosegelelektrophorese mit 1 µl cDNA pro Tasche, welche aus je 0,2 µg RNA umgeschrieben wurde. Die erwartete Amplifikatgröße ist 600 bp. Die Hemmung der RNA-Synthese nach Knockdown konnte für 20 nM siRNA nach 24 und 48 h bestätigt werden.

Mittels Durchflusszytometrie konnte die Unterdrückung der Expression von N-Cadherin ebenfalls nachgewiesen werden. Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte unter Verwendung von *CellQuestPro*<sup>®</sup> Quadrantenstatistik (*BD Biosciences*) und zeigt nach Selektion (*gating*) der HTR-8/SVneo-Zellen (grüne fluoreszierende Zellen) aus der Kokultur eine Minderung der durchschnittlichen roten Fluoreszenz (N-Cadherin Markierung) um 27,7% (Abb. 14).

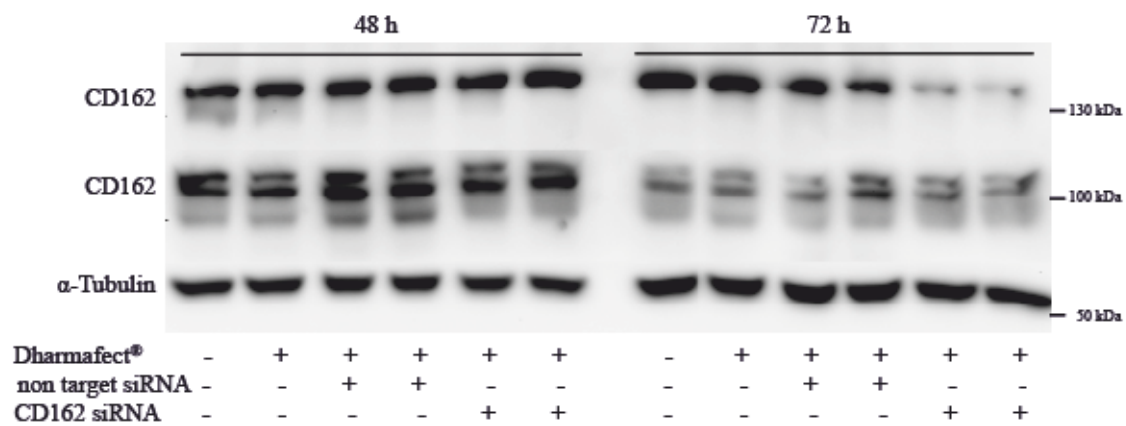


**Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse des N-Cadherin Knockdowns**

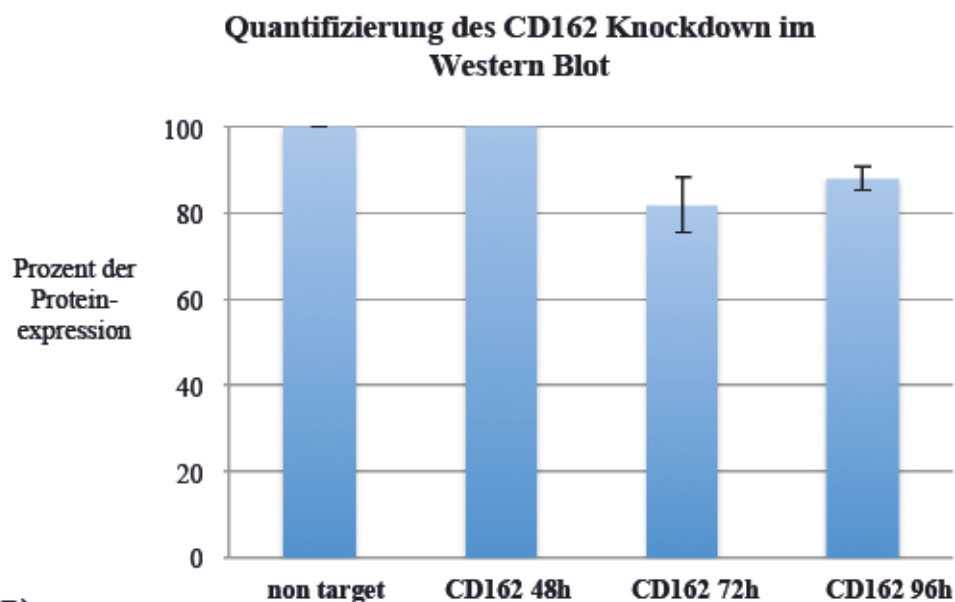
Ergebnisse der durchflusszytometrischen Knockdownanalyse von N-Cadherin in HTR-8/SVneo-Zellen in der Kokultur mit HUVEC-Zellen. Als Kontrolle diente der *non target* Knockdown. Streudiagramm: der x-Achsenparameter stellt die Intensität der *CellTracker™ Green* Fluoreszenz (Differenzierung von grün gefärbten HTR-8/SVneo- und ungefärbten HUVEC-Zellen), der y-Achsenparameter die Intensität der rot markierten N-Cadherine dar. Quadranteneinteilung (*gating*) innerhalb der HTR-8/SVneo-Zellen erfolgte mittels N-Cadherin ungefärbter Isokontrolle der HTR-8/SVneo-Zellen.

#### 4.2.2 Knockdown von CD162

Die Etablierung der Herabregulation des CD162-Moleküls gestaltete sich wesentlich schwieriger. Per Western Blot lies sich der Knockdown in HTR-8/SVneo-Zellen nicht verlässlich nachweisen. Die Quantifizierung der durchschnittlichen Proteinsuppression im Western Blot ergab nach 72 h siRNA-Inkubation 18%, nach 96 h 12% (Abb.15).



A)

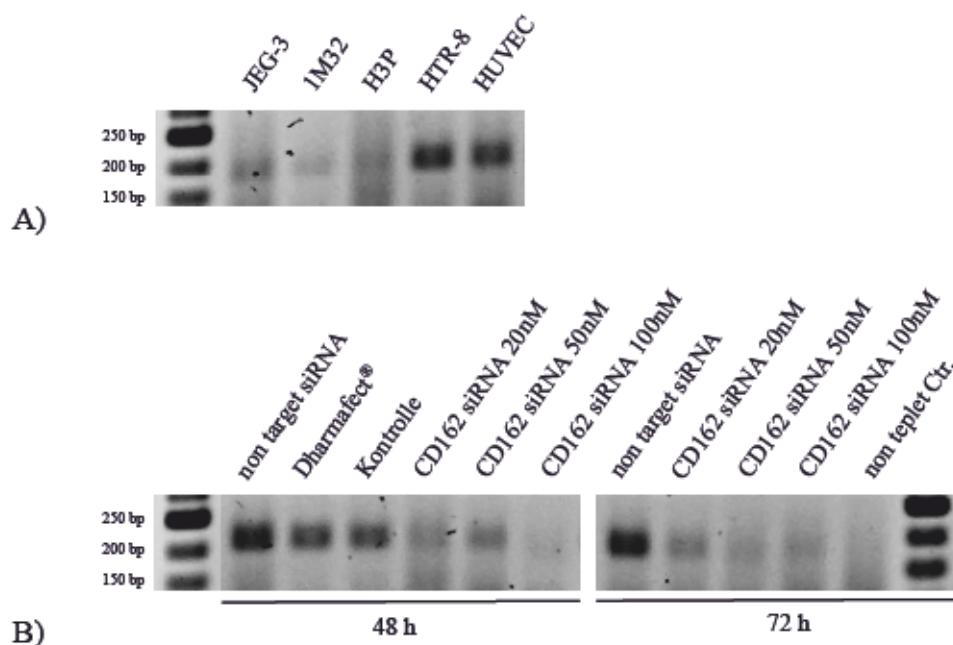


B)

**Abb. 15: Western Blot Kontrolle des CD162 Knockdowns in HTR-8/SVneo-Zellen**

A) Immunochemische Detektion von CD162 nach SDS-Gelelektrophorese und Western Blot in HTR-8/SVneo-Zellen. Die aufgetragene Proteinmenge pro Kammer betrug 20  $\mu$ g, als zusätzliche Ladekontrolle gleicher Proteinmengen diente  $\alpha$ -Tubulin. Ein CD162-Knockdown konnte nach 72h siRNA-Inkubation nachgewiesen werden. Die Kontrollen (Medium, DharmaFECT®, non target siRNA) zeigen keine relevanten Veränderungen der Proteinexpression. B) Balkendiagramm der Quantifizierung des CD162-Knockdowns im Western Blot mittels *Alpha View*® von *Cell Biosciences* (6 unabhängige Versuchsreihen). Nach 48 h siRNA Transfektion ist kein Knockdown, nach 72 h ein Knockdown von 18%, nach 96 h von 12%, zu verzeichnen. Die senkrechte Klammer gibt den Standarderror an.

Auf RNA-Ebene ließ sich die Verminderung der mRNA für CD162 demonstrieren und der Knockdown nach Transfektion von 20, 50 und 100 nM spezifischer siRNA nach 48 und 72 h Inkubation bestätigen (Abb. 16). Unterschiede im mRNA-Expressionslevel sind nur mit einer realtime-PCR quantifizierbar. Die Ergebnisse der CD162-RNA Transkription in den Zelllinien im Vergleich korreliert mit den Ergebnissen des Western Blots.



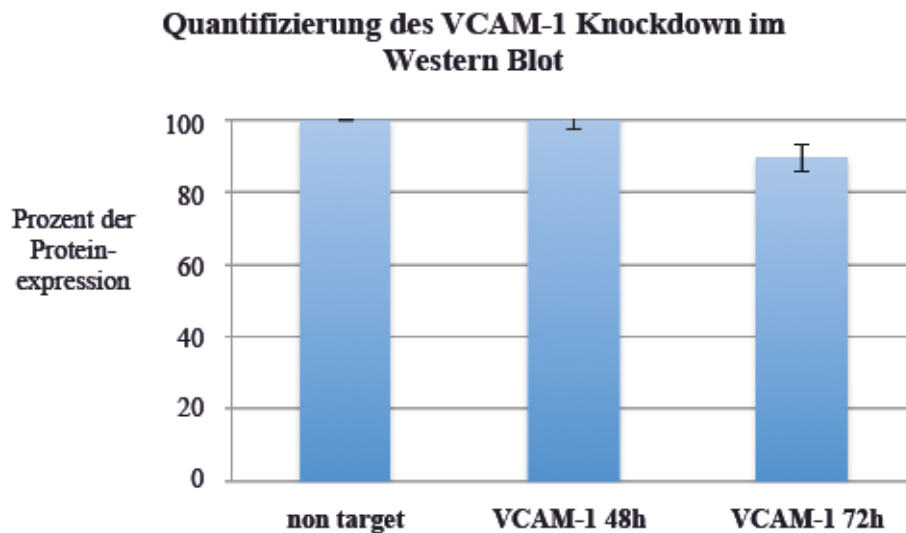
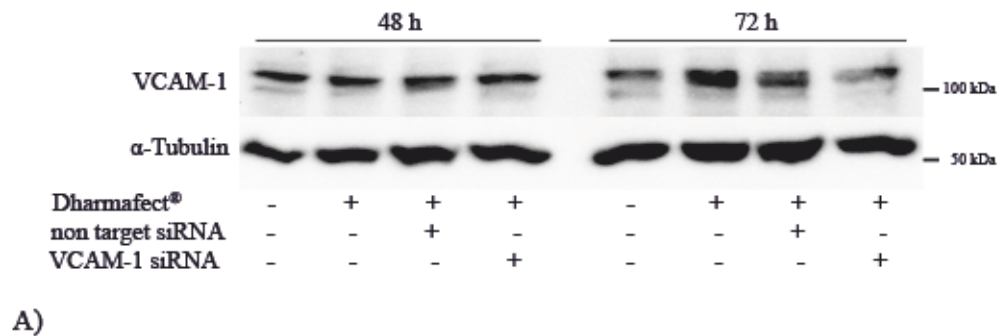
**Abb. 16: cDNA Nachweis von CD162 in den Zelllinien und nach Protein-Knockdown**

Dargestellt sind die PCR-Amplifikate von CD162 cDNA nach Agarosegelelektrophorese mit 1 µl cDNA pro Tasche, welche aus je 0,5 µg RNA umgeschrieben wurde. Die erwartete Amplifikatgröße ist 175 bp. Als Negativkontrolle dient eine *non-template*-Kontrolle. A) Die CD162-RNA Transkription in HUVEC- und HTR-8/SVneo-Zellen ist eindeutig, während sie für JEG-3, AC-1M32 und AC-H3P nur sehr schwach, wenn überhaupt vorhanden ist. B) Die Hemmung der RNA-Synthese nach Knockdown kann für 20, 50, und 100 nM nach 48 und 72 h bestätigt werden.

#### 4.2.3 Knockdown von VCAM-1

Eine VCAM-1 Herabregulation konnte in der extravillösen Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo mit einer siRNA Menge von 20 nM und 2 µl DharmaFECT® pro Well (9,6 cm<sup>2</sup>) bei einer Zellkonfluenz von 80-90% etabliert werden. Im Western Blot zeigt sich 72 h nach Knockdown eine Abnahme der Proteinexpression. (Abb. 17).





**Abb. 17: Western Blot Kontrolle des VCAM-1 Knockdowns in HTR-8/SVneo-Zellen**

A) Immunochemische Detektion von VCAM-1 nach SDS-Gelelektrophorese und Western Blot in HTR-8/SVneo-Zellen. Die aufgetragene Proteinmenge pro Kammer betrug 40 µg, als zusätzliche Ladekontrolle gleicher Proteinmengen diente α-Tubulin. Eine Herabregulation von VCAM-1 lies sich nach 72 h siRNA Inkubation etablieren, wobei die Proteinexpression nur geringgradig unterdrückt werden konnte. Die Kontrollen (Medium, DharmaFECT®, *non target* siRNA) zeigen keine relevanten Veränderungen der Proteinexpression.

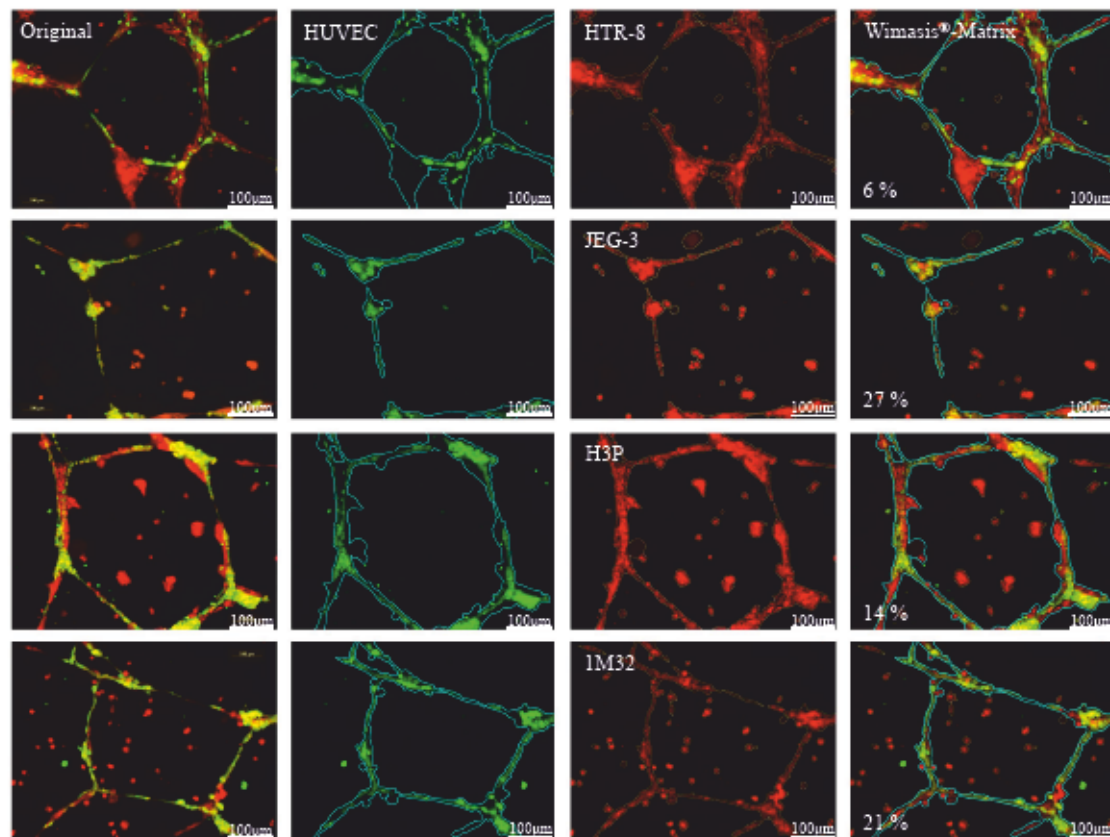
B) Balkendiagramm der Quantifizierung des VCAM-1-Knockdowns im Western Blot mittels *Alpha View*® von *Cell Biosciences* (4 unabhängige Versuchsreihen). Nach 48 h siRNA Transfektion wird kein Knockdown, nach 72 h ein Knockdown von 11% erreicht. Die senkrechte Klammer gibt den Standarderror an.

Die Genexpressionsanalyse zur Kontrolle der siRNA-Transfektion mittels mRNA und PCR misslang bei VCAM-1. Zwei Versuchsansätze zeigten unspezifische Banden, welche keine Interpretation erlaubten (Daten nicht dargestellt).

### **4.3 Interaktionsanalyse von Trophoblastzellen mit Endothelzelltubuli in der dreidimensionalen Kokultur auf Matrigel®**

#### **4.3.1 Interaktion verschiedener Trophoblastzelllinien mit Endothelzelltubuli auf Matrigel®**

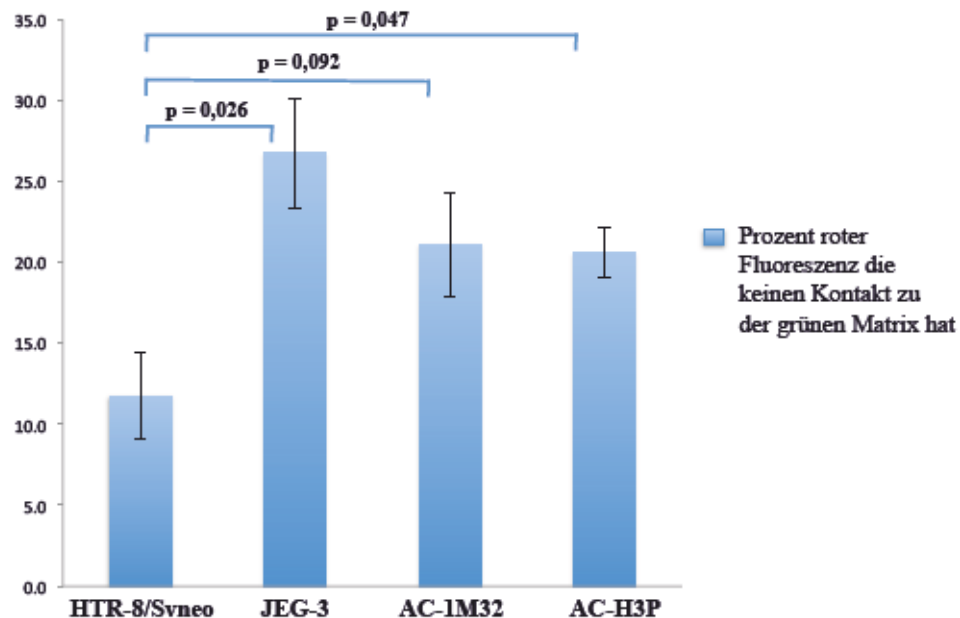
Die Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe hatten eine ungleiche Interaktion der verschiedenen Trophoblastzelllinien mit Endothelzelltubuli in der dreidimensionalen Zellkultur gezeigt (Klas 2010). Die Analyse der Wechselbeziehungen von JEG-3, AC-1M32 und AC-H3P als cytotrophoblastäre, ortsständige Zelllinien im Gegensatz zu HTR-8/SVneo-Zellen als invasive, extratrophoblastäre Zellen mit den HUVEC-Tubuli auf Matrigel® mittels Wimasis® bestätigte signifikante Unterschiede. Mit Hilfe dieser softwaregestützten Internetplattform-basierten Auswertung über die Firma *Wimasis Image Analysis*® wurde die untersucherunabhängige Auswertung der Zellinteraktionen etabliert (Abb. 18). Statistisch ergaben sich in der Quantifizierung signifikante Differenzen zwischen JEG-3 und AC-H3P verglichen mit HTR-8/SVneo-Zellen. AC-1M32-Zellen zeigten ähnliche Interaktion wie die anderen zwei villösen Trophoblastzelllinien, die Ergebnisse aus drei Versuchsreihen waren jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 19).



**Abb. 18: Quantifizierung der Zellinteraktion verschiedener Trophoblastzelllinien mit Endothelzelltubuli in der 3D-Kokultur auf Matrigel® mittels Wimasys Image Analysis®**

Matrigel-Aufnahmen mit 10x Objektiv des Epifluoreszenzmikroskops AxioObserver Z1 der Firma Zeiss. Die Endothelzellen HUVEC sind mit grünem Fluoreszenzfarbstoff, die Trophoblastzellen mit rotem dargestellt. Von links nach rechts: originale Kokulturaufnahme, HUVEC-Tubuli als Basis einer Matrix (Umrandung), Trophoblastzellen mit Matrix (Umrandung der, in die Analyse eingehende, Fluoreszenz), Kokultur mit Matrix als Basis der quantitativen Wimasys®-Analyse. Quantifiziert wurde die rote Fluoreszenz welche keinen Kontakt zu der etablierten HUVEC Matrix hatte. Von oben nach unten: Trophoblastzelllinien HTR-8/SVneo, JEG-3, AC-1M32 und AC-H3P. Die Kokulturen mit JEG-3-, AC-H3P- und AC-1M32-Zellen weisen deutlich geringere Zellinteraktion mit den HUVEC-Tubuli auf als die extravillösen HTR-8/SVneo-Trophoblastzellen.

### Matrigel® der verschiedenen Trophoblastzelllinien:



**Abb. 19: Auswertung der Interaktion verschiedener Trophoblastzelllinien mit Endothelzelltubuli in der 3D-Kokultur auf Matrigel®**

Balkendiagramm mit statistischer Auswertung der Zell-Interaktionen nach quantitativer Wimasis®-Analyse. Zusammengefasst sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchsreihen pro Trophoblastzelllinie. Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet. Die senkrechte Klammer gibt den Standarderror an.

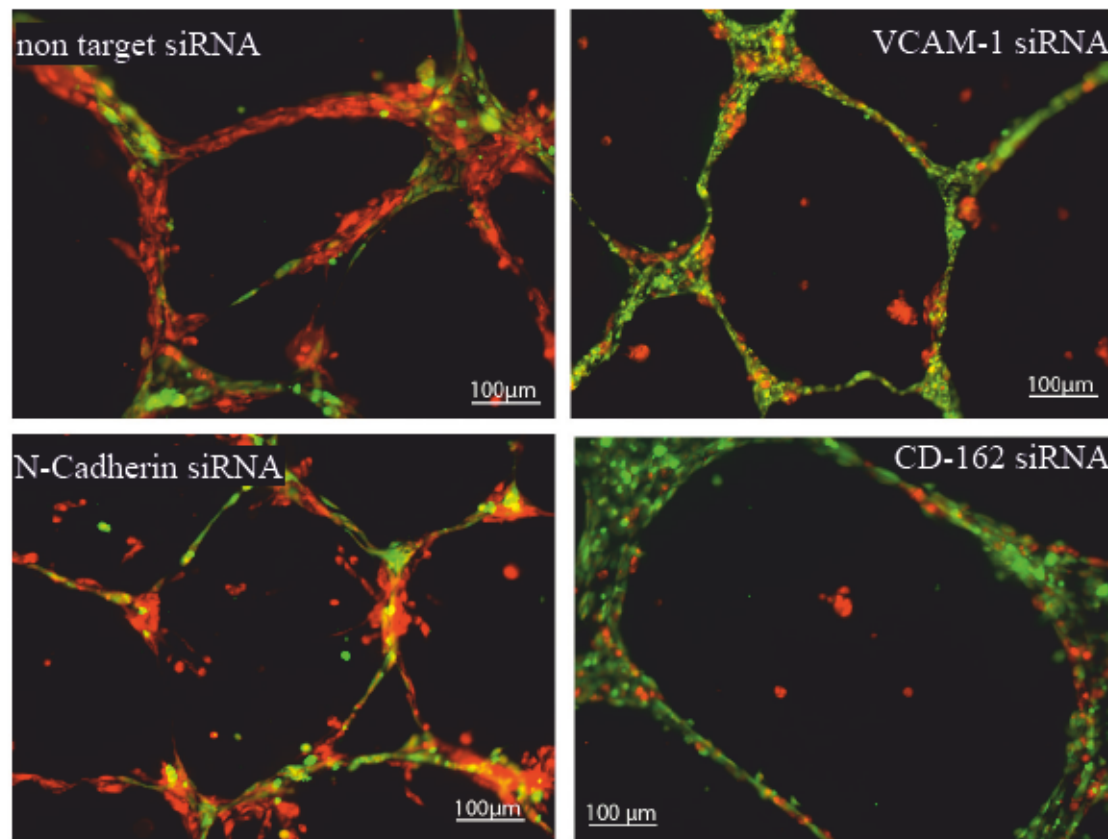
#### 4.3.2 Interaktionsanalyse nach Knockdown der als Kandidaten für die spezifische Interaktion identifizierten Adhäsionsmoleküle in HTR-8/Svneo- Zellen

Die mitgeführten Kontrollen aus Medium, reinem DharmaFECT® und unspezifischer (*non target*) siRNA ergaben untereinander weder eindeutige qualitative noch quantitative Unterschiede. Aufgrund dessen wird im Folgenden der Knockdown-Effekt der spezifischen siRNA Transfektion mit *non target* Kontrollen verglichen.

##### 4.3.2.1 N-Cadherin Knockdown

Nach Knockdown von N-Cadherin in den HTR-8/SVneo-Zellen zeigen diese in Matrigel-Kokulturen eine deutlich reduzierte Interaktion mit den Endothelzelltubuli. (Abb. 20).





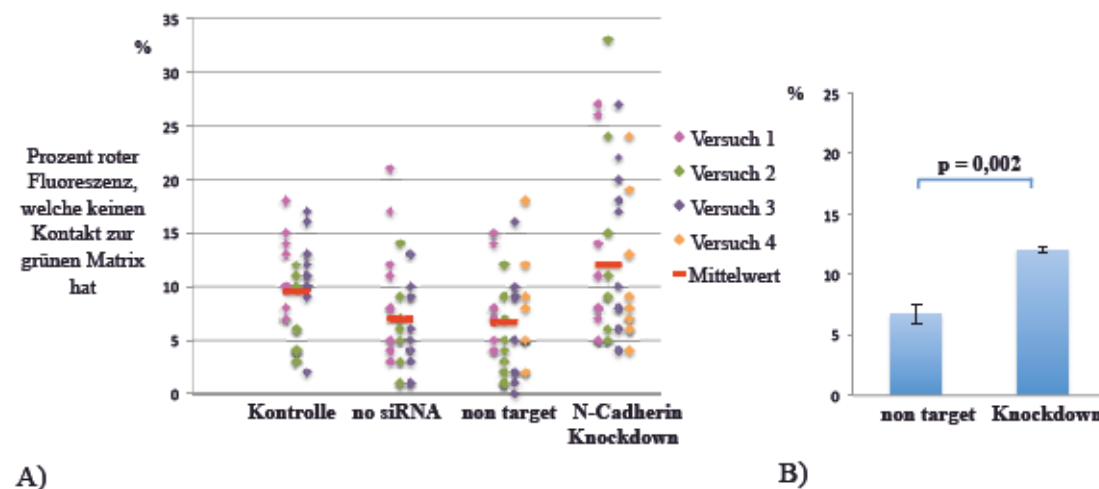
**Abb. 20: Qualitative Knockdownanalyse der selektierten Adhäsionsmoleküle in der 3D-Kokultur auf Matrigel®**

Matrigel®-Kokulturaufnahmen mit 10x Objektiv des Epifluoreszenzmikroskops AxioObserver Z1 der Firma Zeiss. Dargestellt sind jeweils eine exemplarische Aufnahme der 3D-Kokulturen von *non target*, N-Cadherin-, VCAM-1 oder CD162 transfizierten HTR-8/SVneo-Zellen mit HUVEC-Tubuli. Es zeigt sich vor allem nach N-Cadherin Knockdown eine Zunahme der prozentuellen roten Fluoreszenz (HTR-8/SVneo-Zellen), welche nicht mit den grünen HUVEC-Netzen in Berührung kommt.

Die Quantifizierung von vier Versuchen ergab einen signifikant herabgesetzten Kontakt von roten Zellen mit der grünen Endothelmatrix (Abb. 21). Die folgende Abbildung veranschaulicht die durch *Wimasis Image Analysis*® ermittelten Prozentsätze aller Versuchsdurchgänge des N-Cadherin Knockdowns mit den berechneten Mittelwerten. Eine Zusammenfassung der Mittelwerte aus den einzelnen Versuchsreihen verdeutlicht die Unterschiede der prozentuellen Trophoblast-Endothel-Interaktion von HTR-8/SVneo-Zellen mit N-Cadherin spezifischem

Knockdown im Gegensatz zur Behandlung mit *non target* siRNA (Abb. 22).

### Wimasisauswertung N-Cadherin Versuch 1-4



**Abb. 21: Wimasisauswertung der N-Cadherin Kokulturaufnahmen**

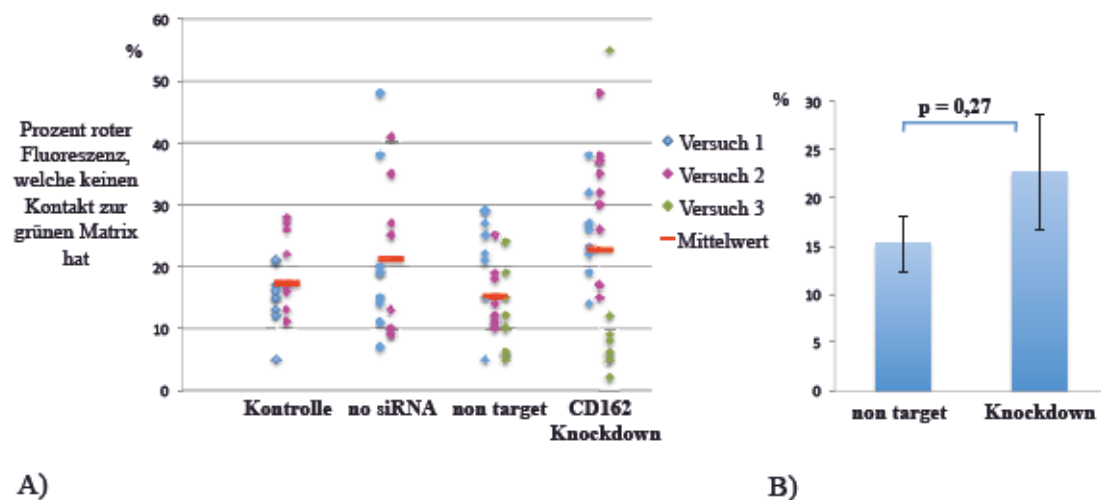
A) Punktdiagramm mit Darstellung der Rohdaten der Wimasis<sup>®</sup>-Analyse für die vier Versuchsreihen des N-Cadherin Knockdowns, wobei beim vierten Versuch auf erneute Kontrollen mittels Medium und reinem DharmaFECT<sup>®</sup> verzichtet wurde. Der Prozentsatz der rot fluoreszierenden HTR-8/SVneo-Zellen, welche keinen Kontakt zu der, durch HUVEC-Zellen gebildete, grüne Zellmatrix hat steigt nach Knockdown in jedem Versuchsansatz.

B) Balkendiagramm aus den Mittelwerten der vier Versuchsreihen. Die senkrechte Klammer gibt den Standarderror an. Nach N-Cadherin Knockdown ist der Anteil HTR-8/SVneo-Zellen ohne Kontakt zu den HUVEC-Tubuli im Vergleich zu der *non target* Kontrolle signifikant erhöht ( $p = 0,002$ ).

#### 4.3.2.2 CD162 Knockdown

Nach Knockdown von CD162 zeigte sich ebenfalls eine Abnahme der Interaktion der HTR-8/SVneo-Zellen mit den Endothelnetzen in der Matrigel-Kokultur (Abb. 20). Quantitativ konnte diese Beobachtung verifiziert werden (Abb. 22). Die durchschnittliche prozentuelle Minderung der Zellinteraktion nach CD162 Knockdown im Vergleich zu der Behandlung mit *non target* siRNA wird in Abbildung 22 für die drei Versuchsreihen zusammengefasst verdeutlicht.

### Wimasisauswertung CD162 Versuch 1-3



**Abb. 22: Wimasisauswertung der CD162 Kokulturaufnahmen**

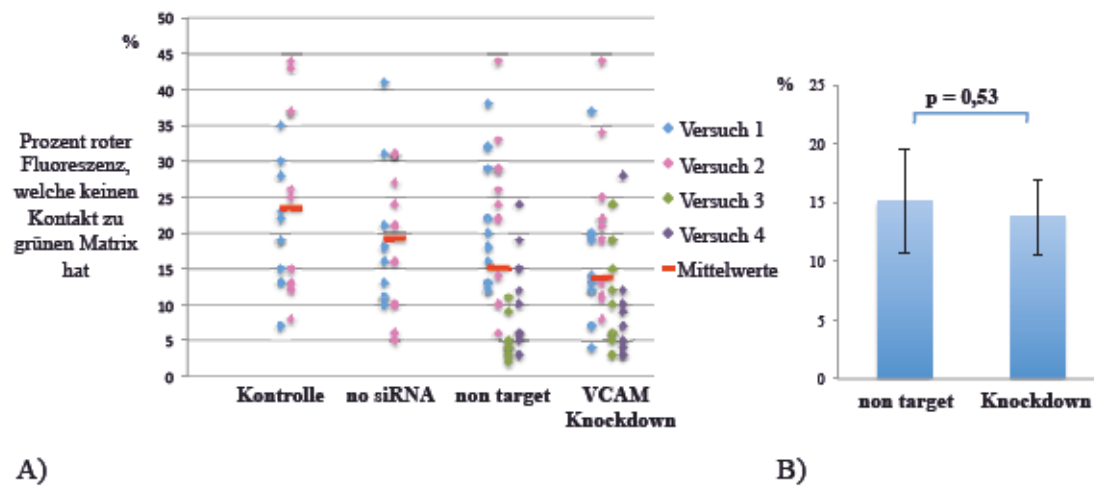
A) Punktdiagramm mit Darstellung der Rohdaten der Wimasis® Analyse für den CD162 Knockdown. Die vollständige Versuchsreihe wurde zwei Mal durchgeführt, bei der dritten wurde auf erneute Kontrollen mittels Medium und reinem DharmaFECT® verzichtet. Nach Knockdown steigt in jedem Versuchsansatz der durchschnittliche Prozentsatz der HTR-8/SVneo-Zellen, welche keinen Kontakt zu den Endothelnetzen ausbilden.

B) Balkendiagramm aus den Mittelwerten der drei Versuchsreihen des CD162 Knockdowns für die *non target* und CD162 spezifische siRNA Behandlung. Die senkrechte Klammer gibt den Standarderror an. Durch CD162 Knockdown erhöht sich der Prozentsatz an Trophblastzellen, welche unabhängig der Endothelzelltubuli wachsen ( $p = 0,27$ ).

#### 4.3.2.3 VCAM-1 Knockdown

Nach VCAM-1 Knockdown zeigte sich keine Veränderung in der Interaktion der HTR-8/SVneo-Zellen mit den Endothelzelltubuli (Abb. 20). Die quantitative Analyse durch *Wimasis Image Analysis*® bestätigt, dass der Anteil an HTR-8/SVneo-Zellen ohne Endothelbindung sich nach VCAM-1 Knockdown nicht verändert (Abb. 23).

### Wimasisauswertung VCAM-1 Versuch 1-4



**Abb. 23: Wimasisauswertung der VCAM-1 Kokulturaufnahmen**

A) Punktdiagramm mit Darstellung der Rohdaten der Wimasis® Analyse für den VCAM-1 Knockdown. Die vollständige Versuchsreihe wurde zwei Mal durchgeführt, bei der dritten und vierten wurde auf erneute Kontrollen mittels Medium und reinem DharmaFECT® verzichtet. Nach Knockdown zeigt sich weder eine signifikant verminderte noch erhöhte Zellinteraktion. B) Balkendiagramm aus den Mittelwerten der drei Versuchsreihen des VCAM-1 Knockdowns für die *non target* und VCAM-1 spezifische siRNA Behandlung. Die senkrechte Klammer gibt den Standarderror an. Die Trophoblast- und Endothelzellinteraktion erscheint trotz VCAM-1 Knockdown unverändert ( $p = 0,53$ ).



## 5 Diskussion

### 5.1 Kritische Betrachtung der angewandten Methoden

#### 5.1.1 Zellkultur inklusive 3D-Kokultur auf Matrigel®

Die Untersuchung der Plazentation stellt aufgrund ihrer Unzugänglichkeit, Einzigartigkeit und Komplexität eine besondere Herausforderung dar. Die Erforschung möglicher Einflussfaktoren lässt sich daher nur unter Verwendung von Modellen erreichen (Mardon et al. 2007). Modelle sind jedoch immer begrenzte Abbildungen der Realität, welche nur Einzelaspekte erfassen. Ziel ist es, diese Einzelaspekte so realitätsnah wie möglich darzustellen (Stachowiak 1973). Abhängig von der in dieser Arbeit zu untersuchenden Fragestellung entschieden wir uns für den Einsatz eines *in vitro* Zellkulturmodells. Dieses ermöglicht die Analyse von molekularen Mechanismen und Zellverhalten unter annähernd konstanten Bedingungen. Eine wesentliche Einschränkung der zweidimensionalen Zellkultur stellt dabei der potentielle Verlust von differentiellen Zellfunktionen dar, die nur in einer dreidimensionalen Umgebung erreicht werden können (LaMarca et al. 2005). Zusätzlich zur klassischen zweidimensionalen Zellkultur in der Flasche oder auf der Platte fand deshalb ein dreidimensionales Zellkulturmodell Anwendung. Die 3D-Kokultivierung der Zellen auf Matrigel® ermöglicht eine Annäherung an *in vivo* Verhältnisse mit einer realitätsnäheren Darstellung der Zellfunktion, -migration, -invasion und -interkommunikation (Scherberich und Beretz 2000, Pampaloni et al. 2007). Aufgrund dessen ist der Gebrauch von Matrigel® auch in der Erforschung anderer biologischer Prozesse wie Infektionskrankheiten, Transplantations-, und Karzinomverhalten inzwischen weit verbreitet (Uemura et al. 2010, Benton et al. 2014, Molina-Jimenez et al. 2012). Das in dieser Arbeit verwendete *Growth Factor Reduced Matrigel*® (BD Biosciences) ist eine biologisch aktive Matrix mit über 1200 unterschiedlichen Proteinen. Dadurch entstehen ein Vielzahl unterschiedlicher Wechselwirkungen mit den darin inkubierten Zellen. Highet et al. beobachteten zum Beispiel eine Begünstigung der endothelialen Morphologie der, auf Matrigel® proliferierenden, HTR-8/SVneo-Zellen mit Ausbildung von Tubuli-Formationen auch

in Abwesenheit von Endothelzellen (Highet et al. 2012). Johnsen bestätigt eine endotheliale Morphologie der HTR-8/SVneo-Zellen auf Matrigel® (Johnsen et al. 2011). Dieser Vorgang der Tubuli-Bildung wird als Hinweis auf ein *vascular cell mimicry*, welche extravillöse Trophoblastzellen auch *in vivo* im Rahmen der Invasion der maternalen Spiralarterien durchlaufen, interpretiert (Zhou et al. 1997b, Davis und Senger 2005). Der Einfluss der Komponenten des Matrigels® auf die Zellen scheint dabei, zusätzlich zum ermöglichten dreidimensionalen Wachstum, ein Grund für die Annäherung an die *in vivo* Situation zu sein. Auch *in vivo* beeinflusst die extrazelluläre Matrix aufgrund ihrer spezifischen Organisation und der enthaltenen Zytokine die Zellführung, -migration und -invasion (Oefner et al. 2015). Diskutiert wird dabei, dass die extrazelluläre Matrix eine wichtige Voraussetzung für den epithelialen-mesothelialen-Übergang in den differenzierenden extravillösen Trophoblastzellen darstellt (Zhou et al. 1997b, Davis und Senger 2005). Gleichzeitig scheint sie ebenso wichtig für den mesenchymalen-endothelialen Übergang im Rahmen der Interaktion der Trophoblastzellen mit den Endothelzellen zu sein. Die Verwendung von Matrigel in der 3D-Zellkultur optimiert somit eine Annäherung an die *in vivo* Bedingungen der Trophoblastinvasion, -migration und -interaktion mit den Endothelzellen.

Die Verwendung von Zelllinien statt Primärzellen in der Zellkultur stellt grundsätzlich einen weiteren Kompromiss in der Erforschung von biologischen Prozessen dar. Primäre villöse Trophoblastzellen aus Abortmaterial stehen jedoch nur eingeschränkt zur Verfügung, müssen aufgereinigt und isoliert werden und stellen in Kultur rasch ihre Proliferation ein (Bilban et al. 2010, Morrish et al. 2002). Zusätzlich besteht eine hohe interexperimentelle Variabilität angesichts des unterschiedlichen genetischen Hintergrundes der Primärzellen. Diese Zellen sind daher für Versuchsreihen, in denen isolierte Teilaspekte des Zellverhaltens genauer untersucht werden sollen ungeeignet, da sich zu viele Versuchsbedingungen von Experiment zu Experiment unterscheiden. Der Einsatz von Zelllinien ermöglicht hingegen eine günstige, unkomplizierte Handhabung und die molekulare Manipulation von Einzelaspekten, zum Beispiel durch siRNA Transfektion, mit einer geringen interexperimentellen Variabilität.

Als Modell für die extravillösen Trophoblastzellen wurden in dieser Arbeit HTR-8/SVneo- Zellen von Charles H. Graham eingesetzt. Durch Transfektion des groß T Antigens des Simian Virus 40 in primäre extravillöse Trophoblastzellen,

isoliert aus Ersttrimester Plazenten, gelang es deren Lebensdauer zu verlängern (Graham et al. 1993). Die Transfektion des groß T Antigens zur Immortalisierung von Zellen ist verbreitet. Eine Analyse der dadurch herbeigeführten Zellveränderungen deutet darauf hin, dass das Antigen mit den Tumorsuppressorgen p53 und Rb interagiert. Hierdurch entstehe möglicherweise eine onkogenetische Transformation der Zelle welche die verlängerte Proliferation oder Immortalität der Zelle bewirkt (Lin und Simmons 1991). Beim *in vivo* Trophoblasten besteht dagegen eine zeitliche Trennung zwischen Proliferation und Invasion. Der Trophoblast entwickelt seine invasiven Eigenschaften erst nach dem Einstellen der Proliferation (Helige et al. 2008). Obwohl die Konversion der Primärzelle zu einer Zelllinie mit verlängerter Lebensdauer zu Veränderung des Phänotyps und auch des Invasionsverhaltens führt (Bilban et al. 2010), eignen sich die HTR-8/SVneo-Zellen als Modell für die extravillösen Trophoblastzellen (Shiverick et al. 2001). Wie extravillöse Trophoblastzellen besitzen HTR-8/SVneo Zellen beispielsweise eine hohe Expression von invasiven Molekülen wie die Metalloproteinasen MMP2, MMP9 und PLAU, (Suman und Gupta 2012). Des Weiteren ergaben die Expressionsanalyse von Proteasen und Proteaseinhibitoren eine hohe Gemeinsamkeit für HTR-8/SVneo mit extravillösen Trophoblastzellen (Lian et al. 2010). Auch Hannan et al berichten von der größten phänotypischen Gemeinsamkeit zwischen HTR-8/SVneo- und Primärzellen der extravillösen Trophoblasten (Hannan et al. 2010). Kokkinos argumentiert zusätzlich, dass die Expression der Adhäsionsmoleküle einer Typisierung der Zelllinien dienen kann. Analog zu den extravillösen Trophoblastzellen findet sich in den HTR-8/SVneo-Zellen eine hohe Expression von N-Cadherin und keine Expression von E-Cadherin. Die Expression von E-Cadherin und fehlende Expression von N-Cadherin in den, mit Chorionkarzinomzellen immortalisieren Trophoblastzelllinien, wie JEG-3, H3P und M132 ähnelt dabei eher dem Expressionsprofil der cytotrophoblastären, ortsständigen Trophoblastzellen, welche sich vor dem epithelialen-mesothelialen-Übergang befinden (Kokkinos et al. 2010). In unseren Untersuchungen, welche isoliert die Interaktion von invadierenden Trophoblastzellen mit den Endothelzellen der maternalen Spiralarterien untersuchen sollten, verwendeten wir deshalb HTR8/SVneo-Zellen als Modell für die extravillösen Trophoblasten im Matrigel mit Endothelzellen (HUVEC).



### 5.1.2 Quantifizierung der morphologischen Ergebnisse

Die objektive Quantifizierung der Endothel-Trophoblast-Interaktion auf dem Matrigel war die Voraussetzung für die Analyse von Veränderungen in der Interaktion zwischen den Trophoblastzellen und den Endothelzelltubuli. Nur so war es möglich die verschiedenen Interaktionsmuster der Trophoblastzelllinien und den potentiellen Einfluss der identifizierten Kandidatenproteine nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ auszuwerten. Die Firma *Wimasis Image Analysis*<sup>®</sup> bietet internetgestützt eine automatisierte untersucher-unabhängig Auswertung von mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen der Zellkultur an (<http://www.wimasis.com/en/>). In Zusammenarbeit mit den Softwareentwicklern der Firma konnte ein individuell entwickelter Auswertungsalgorithmus konstruiert werden, der die Interaktion der grün gefärbten Endothelzellen und der rot gefärbten Trophoblastzellen in unseren Aufnahmen standardisiert quantifiziert. Die ermittelten Prozentsätze wurden anfangs durch visuellen Vergleich kontrolliert um sicher zu stellen, dass das entwickelte Programm plausible Ergebnisse lieferte. Nach Optimierung der Analyseinstellungen wurde auf weitere optische Kontrollen verzichtet.

Da sich in jedem Gel die HUVEC-Netze unterschiedlich bildeten, mit vielen zarten oder wenigen dicken Strängen, entschieden wir uns für die Quantifizierung der roten Fluoreszenz, (Trophoblastzellen) welche keinen Kontakt zu der grünen Matrix (HUVEC-Tubuli) entwickelt hatte. Würde stattdessen die grüne Fluoreszenz (HUVEC-Tubuli) ohne Kontakt zu roter Fluoreszenz (Trophoblastzellen) ausgewertet werden, ergäbe sich bei zahlreichen zarten Netzen eine erhöhte Fläche von grün ohne rot, obwohl die Zellinteraktion ungestört war. Bei eingeschränkter Motilität und Interaktion der Zellen bleiben die Trophoblastzellen dort wohin sie nach Pipettierung gelandet sind, statt zu den HUVEC-Tubuli zu wandern und sich an die Endothelzellen anzulagern. Umso weniger rote Fluoreszenz ohne Kontakt zu grüner Fluoreszenz ist, desto besser ist dementsprechend die Zellinteraktion.

Bei der Zellinteraktionsanalyse auf Matrigel<sup>®</sup> muss beachtet werden, dass die zugeführten Trophoblastzellen teilweise auch zufällig auf die vorbestehenden endothelialen Tubuli absinken statt aktiv dorthin zu migrieren. Die entstehende Adhäsion der Zellen ist deshalb nicht ausschließlich Produkt einer aktiven Interaktion. Diesem Problem wurde begegnet, indem der Versuchsablauf in den verschiedenen Experimenten durch die Verwendung gleicher Zellzahlen und gleicher Kulturzeiten



möglichst identisch gehalten wurden. Unterschiede im Verteilungsmuster zwischen HTR-8/SVneo- und den villösen Trophoblastzelllinien konnten so quantifiziert werden. Die Veränderung des Zellverhaltens nach Knockdown einzelner Adhäsionsmoleküle wird immer im Vergleich mit nicht kodierender siRNA behandelten Zellen analysiert. Dafür wurden die Prozente der HTR-8/SVneo-Endothelzelltubuli-Interaktion nach Knockdown mit denen der, mit unspezifischer non-target siRNA, transfizierten HTR-8/SVneo-Zellen verglichen. Somit konnte gewährleistet werden, dass die Behandlung der Zellen bis auf die Verwendung unterschiedlicher siRNA identisch war. Aufgrund von unbeeinflussbaren experimentellen Schwankungen dürfen jedoch nur Prozentangaben innerhalb einer Versuchsreihe miteinander verglichen werden. So werden interexperimentelle Unterschiede, zum Beispiel durch gesteigerten Zellstress mit resultierender erhöhter Anzahl toter Zellen im Gel und damit erhöhtem Prozentsatz der Trophoblastzellen ohne Kontakt zu den Endotheltubuli im Gel, in der Analyse beachtet. Die absoluten Zahlen (Prozentsätze) können untereinander im Experiment, nicht jedoch mit Ergebnissen einer anderen Versuchsreihe verglichen werden. In der vergleichenden Analyse wurden deshalb die jeweiligen Unterschiede der Knockdown-Ansätze zur Kontrolle betrachtet. Die in den Knockdown Versuchen mitgeführten Kontrollen bestanden zunächst sowohl aus unspezifischer *non target* siRNA, als auch aus Dharmafect ohne siRNA und eine Kontrolle mit unbehandelten Zellen in zellspezifischem Medium. Bei konstanten Ergebnissen beschränkten wir im Verlauf die Kontrolle auf das Mitführen der unspezifischer *non target* siRNA.

### 5.1.3 Proteinnachweis

Zur Proteinexpressionsanalyse und -quantifizierung wurde in dieser Arbeit primär der Western Blot verwendet. Diese standardisierte Methode stellt ein geeignetes Mittel dar, um bei konstanter Proteinmenge Aussagen über den Expressionszustand eines spezifischen Proteins reproduzierbar zu untersuchen. Während der Nachweis von N-Cadherin in der Arbeitsgruppe bereits etabliert war, musste dies für CD162, P-Selektin, VCAM-1 und VLA-4 noch erfolgen. Da nicht alle Proteine sofort nachweisbar waren, wurden die Versuchsabläufe sukzessiv optimiert.

In dem Wissen, dass ein Herauslösen von membranständigen Proteinen aus ihrem Zellmembranverband oft Schwierigkeiten bereitet, wurden zunächst unterschiedliche Lysepuffer getestet. Wir verglichen einen Triton-X-Puffer, der zuvor bereits in Arbeitsgruppen erfolgreich verwendet wurde, mit standardisiertem RIPA-Lysepuffer und einem Lysepuffer, der zusätzlich zu den Detergenzien noch  $\text{ZnCl}_2$  und Phenylmethylsulphonylfourid enthält (Phenyl-Puffer), miteinander (Tab. 15).

**Tab. 15: Zusammensetzungen der Lysepuffer**

<b>Triton-X-Puffer</b>	<b>Phenyl-Puffer</b>	<b>RIPA-Puffer</b>
0,5% Triton X-100 in 1x TBS, 5ul/ml Proteaseinhibitor	0,02M Tris-HCl, 0,15M NaCl, 0,1% Natriumdesoxycholat, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 5mM EDTA, 0,1mM $\text{ZnCl}_2$ , 1mM Phenylmethylsulphonyl-flourid, 5ul/ml Proteaseinhibitor	0,05M Tris-HCl, 0,2M NaCl, 1% Natriumdesoxycholat, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 4 mM EDTA, 5ul/ml Proteaseinhibitor

Das Ziel, die hydrophoben Membranproteine in eine wässrige Lösung zu bringen, wird durch die Verwendung von Seifen erreicht. Die Erhöhung des Seifenanteils kann durch Triton X-100-, SDS- oder Desoxycholat-Zugabe erzielt werden. Am erfolgreichsten lösten sich die von uns gesuchten Proteinen im RIPA-Lysepuffer. Dieser enthält einen vergleichsweise hohen Anteil von Desoxycholat. Etwa 70–80% der Proteine einer Membranpräparation gehen mit Deoxycholat in Lösung (Hubert Rehm 2010). Die Erhöhung der Ionenstärke des Puffers, beispielsweise durch  $\text{NaCl}$ , fördert zusätzlich die Solubilisierung der Membranproteine. Allerdings kann Desoxycholat je nach pH-Wert und Ionenstärke die Konformation von vielen Proteinen verändern, sodass diese dann denaturieren und später für die Antikörpererkennung schlechter zugänglich sind. Um diesen Effekt abzumildern wurden zusätzlich Stabilisatoren wie EDTA und Proteaseinhibitoren dem Lysepuffer zugefügt (Hubert Rehm 2010).

Eine weitere Ursache für den fehlenden Proteinnachweis kann eine misslungene Überführung der gesuchten Proteine von dem Gel auf die PVDF-Membran im Blot sein. Wir untersuchten deshalb zunächst den Einfluss des Methanolgehaltes im Transferpuffer. Methanol ermöglicht einerseits die Bindung der Proteine an die PVDF-Membran, führt jedoch gleichzeitig zur Verkleinerung der Gelporen, sodass der Übergang der Proteine vom Gel auf die Membran erschwert sein kann (Hubert

Rehm 2010). Durch eine Reduktion des Methanolanteils im Transferpuffer erhofften wir uns eine vollständigere Proteinüberführung auf die Membran, konnten hierdurch allerdings keine interexperimentelle Veränderung verzeichnen.

Des Weiteren wurden bei der Elektrophorese sowohl die Blotzeit, als auch die Stromstärke variiert und so eingestellt, dass die, zwischen 50 und 200 kDa großen, Proteine optimal auf die Membran übertragen wurden. Wir konnten keinen Unterschied bezüglich des Proteintransfers mittels Wet- oder Semi- Dry- Blot erkennen.

Der Überlegung folgend, dass die Konzentration der gesuchten Adhäsionsmoleküle in der Zellmembran möglicherweise zu gering sei, steigerten wir die im Gel aufgetragene Proteinmenge bis 40 µg/ml. Zusätzlich wurde bei weiterhin erfolglosem Proteinnachweis der Primärantikörper konzentriert und die Inkubationszeit des Antikörpers verlängert. Auch unterschiedliche Proteinlösungen zur Blockierung der unspezifischen Proteinbindungsstellen in der Blotmembran (5% Milchblocker oder 10% BSA in PBS) erzeugten keine verbesserte Darstellbarkeit der Proteine.

Bei der Proteindetektion wurde schließlich noch der Einfluss unterschiedlich starker Lumineszenzsubstrate und verschiedener Detektionssysteme (mittels Fotopapier in einer Dunkelkammer oder im Bio-Imaging-System MF-ChemiBis32) untersucht und für unbedeutend empfunden.

Durch die aufgezählten Optimierungen konnte der Proteinnachweis mittels Western Blot für CD162, P-Selektin und VCAM-1 etabliert werden. Die Darstellung von VLA-4 gelang dennoch nicht.

Ein weiteres Problem bei der Analyse von Proteinen im Western Blot ist der Nachweis von unterschiedlich vielen Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht.

Die Angabe des Molekulargewichtes, bei dem das gesuchte Protein nachgewiesen wird, richtet sich nach der Domäne, die vom Antikörper gebunden wird und kann nach Denaturierung des Proteins von dem eigentlichen molekularen Gewicht des Proteins variieren. Durch die Bindung mit der Seife SDS bilden die meisten Proteine



negativ geladene Komplexe, sodass konstante Ladungs- zu Masse-Verhältnisse entstehen und die Protein-Komplexe vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften entwickeln. So können die Proteine selektiv ihrer Größe nach während der Elektrophorese aufgetrennt werden. SDS hat dabei allerdings einen denaturierenden Effekt auf die Proteine. Aufgrund dessen, dass hydrophile Zucker von glykosylierten Proteinen kein SDS binden, kommt es zu Unterschieden im Ladungs/Masse-Verhältnis der SDS-Komplexe glykosylierter Proteine und der nichtglykosylierter Proteinen. Dies ist eine weitere Ursache dafür, dass sich die Proteine nach dem Blotvorgang nicht genau an der ihr zugehörigen kDa-Bande darstellen.

Die Ursachen für multiple Bandendarstellungen sind vielfältig. Veränderung des Proteins nach mehrfachem Passagieren der Zellen, Modifikation des Proteins *in vivo* durch Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung oder Glykosylierung, oder unspezifische Bindung des Antikörpers können Gründe sein. Banden mit kleinerem molekularen Gewicht können durch Prozessierung und enzymatischen Proteinabbau, aber auch durch Splicevarianten des Proteins, entstehen. Unterschiedliche Antikörper können dabei eine unterschiedliche Spezifität für die verschiedenen Proteinformen aufweisen und so antikörperabhängig zu unterschiedlichen Bandenmustern führen. So kam es in der Westernblot Analyse von VCAM-1, das eigentlich eine molekulare Masse von 81 kDa hat, entsprechend den Herstellerangaben, zur Darstellung mehrerer Banden bei 50 kDa und 100 kDa. Eine mögliche Erklärung lieferten Untersuchungen von Hahne et al.. Sie erkannten, dass, neben dem 81 kDa großem VCAM-1 Molekül, weitere Glykoproteine durch zahlreiche monoklonale Antikörper gegen VCAM-1 erkannt werden. Die biochemische Analyse dieser Glykoproteine ergab, dass sie möglicherweise Splicevarianten von VCAM-1 sind (Hahne et al. 1994). Zusätzlich zu den VCAM-1 Isoformen besteht die Möglichkeit, dass VCAM-1 während der Zelllyse, beispielsweise durch den hohen Desoxycholat- und SDS-Anteil im Lysepuffer, denaturiert und dadurch seine Größe und so auch die Wandereigenschaft im Gel variiert.

Eine weitere Herausforderung war, dass der Grad der Proteinexpression im Western Blot teilweise Schwankungen unterworfen war. Dies wird hier exemplarisch am Nachweis von CD162 diskutiert. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe konnte mittels

PCR eine konstante Genexpression von CD162 spezifisch für HUVEC- und HTR-8/SVneo-Zellen nachgewiesen werden. In den Experimenten mittels Western Blot jedoch, ließen sich gelegentlich geringste Mengen von CD162 auch in JEG-3, AC-1M32 und AC-H3P nachweisen. Diese vereinzelte Expression von CD162 in den villösen Trophoblastzelllinien war sehr gering und wurde deshalb nicht als Ausschlusskriterium für eine durch CD162 vermittelte zellspezifische Interaktion zwischen HTR-8/SVneo und HUVEC-Zellen gewertet. Ursache dieser Inkonsistenz könnte eine Expression des Moleküls nach Zellstress sein. CD162 wird *in vivo* vor allem in frühen Stadien der Inflammation exprimiert und vermittelt hier den Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen (Taylor et al. 2000). Auch der Knockdown von CD162 konnte in HTR-8/SVneo-Zellen nicht verlässlich nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass CD162 intrazellulär gespeichert wird und bei Stimulation stabil in die Zellmembran eingebaut wird (Taylor et al. 2000). Es ist daher möglich, dass die Hemmung der Translation durch siRNA nur begrenzte Wirkung auf die eigentlich vorhandene Proteinmenge in der Zelle hat. Die Bestätigung der erfolgreichen siRNA-Transfektion konnte jedoch durch den Nachweis auf mRNA Ebene erbracht werden.

Die VCAM-1 Expression im Western Blot lies sich ebenfalls geringfügig in JEG-3, AC-1M32 und AC-H3P- Zellen nachweisen. Anhand von Publikationen anderer Arbeitsgruppen ist bekannt, dass die VCAM-1-Expression in Endothelzellen mittels Stimulation durch  $\text{TNF}\alpha$  und VEGF gesteigert werden kann (Osborn et al. 1992, Lechleitner et al. 1998). Beide dieser Stimulationsfaktoren konnten während der Plazentation in der Umgebung von extravillösen Trophoblastzellen nachgewiesen werden (Osborn et al. 1992, Lechleitner et al. 1998).

Um eine HTR-8/SVneo und HUVEC spezifische Expression des VCAM-1-Proteins zu prüfen, wurde deshalb der stimulierende Einfluss von  $\text{TNF}\alpha$  und VEGF auf die VCAM-1-Expression in den übrigen Trophoblastzelllinien untersucht. Die Expression von VCAM-1 in den Trophoblastzelllinien zeigte nach 24h Stimulation keine Veränderung. Weder  $\text{TNF}\alpha$  noch VEGF scheinen daher einen größeren Einfluss auf den exprimierten VCAM-1 Anteil in Trophoblastzellen zu haben. Der expressionsinduzierende Effekt von  $\text{TNF}\alpha$  auf HUVEC Zellen konnte von uns bestätigt werden, nicht aber der von VEGF. Die Untersuchung des VCAM-1



Rezeptors VLA-4 sollte die Spezifität der VCAM-1 vermittelten Interaktion bestätigen. Der Nachweis auf Genebene in HTR-8/SVneo- und HUVEC-Zellen, nicht aber in den übrigen Trophoblastzelllinien bestätigte zunächst, dass VCAM-1 auch als möglicher, spezifischer Interaktionspartner von extravillösen Trophoblastzellen und Endothelzellen fungieren kann.

Obwohl wir mit dem Western Blot auf einige Herausforderungen stießen, sahen wir von einer Proteinexpressionsanalyse mittels Durchflusszytometrie ab. In den Vorversuchen zur Charakterisierung der Zelllinien durch Martina Klas konnte nur der Nachweis von Cadherinen mittels Durchflusszytometrie verlässlich etabliert werden (Klas 2010). Die adhärent wachsenden Zellen müssen hierfür in eine Einzelzellsuspension überführt werden. Dabei ist eine Beschädigung der Adhäsionsmoleküle in Funktion, Integrität und Membranständigkeit nahezu unvermeidlich. Um die Adhäsionen möglichst schonend zu lösen wurden sie durch Inkubation mit Accutase getrennt. Durch diese Methode ließen sich die Zellen jedoch schlechter vereinzeln. Bei unzureichender Vereinzelung ist eine reproduzierbare Quantifizierung von membranständigen Proteinen, die dem Antikörper zugänglich sein müssen, nicht möglich. Dies zeigte sich auch bei unserem Versuch den N-Cadherin Knockdown mittels FACS zu analysieren. Im Vergleich zu den Western Blot und PCR Ergebnissen bei denen N-Cadherin nach jedem Knockdown-Versuch kaum nachzuweisen war, ergab sich bei der FACS Analyse ein Unterschied der mittleren Quadrantenfluoreszenz von lediglich 27,7 % (*non target* zu spezifischer siRNA). Teilweise ist dies möglicherweise zusätzlich durch die Methode der Knockdown-Quantifizierung im FACS begründbar, da die Einteilung der Quadranten nach Isotypen-Kontrolle nur ungenau möglich ist. Das wiederum macht die Bewertung anhand der mittleren Fluoreszenzintensität ebenfalls ungenau. Würden wir jedoch annehmen, dass die FACS Ergebnisse korrekt sind, würde schon ein N-Cadherin Knockdown von 30% genügen um eine signifikante Minderung der HTR-8/SVneo und HUVEC-Interaktion in der 3D-Kokultur auf Matrigel® zu verursachen.

#### 5.1.4 Genexpressionsanalyse

Ein Großteil der Genexpressionsanalysen wurde in Vorversuchen der Arbeitsgruppe durch Martina Klas durchgeführt und dienten als Ausgangspunkt für die weiterführende Forschung dieser Arbeit. Aufgrund einiger uneindeutiger Ergebnisse in der Proteinanalyse wurden die Genexpressionsanalysen im Rahmen dieser Arbeit ergänzt. So führten wir bei fehlendem Nachweis der Expression des VCAM-1 Rezeptors VLA-4 im Westernblot die PCR zur Analyse der mRNA Expression durch. Hier zeigte sich VLA-4 spezifisch in HTR-8/SVneo- und HUVEC- Zellen exprimiert. Der alleinige Nachweis von VLA-4 auf Transkriptionsebene kann unterschiedliche Ursachen haben. Durch extrazelluläre Signale kann die Translation verhindert, oder das posttranslationale Protein wieder abgebaut werden. Aufgrund des positiven RNA-Nachweises trotz fehlender Proteinexpression wurden VLA-4 zusammen mit VCAM-1 dennoch als potenzieller Kandidat zur Interaktionsmediation zwischen HTR-8/SVneo und HUVEC-Zellen bewertet.

Zusätzlich nutzten wir die Genanalyse zur Validierung der erfolgreichen siRNA-Transfektion. Die mRNA für N-Cadherin und CD162 war nach siRNA Transfektion fast nicht mehr nachweisbar. Der Versuch die VCAM-1-Genexpression und den Knockdown direkt per PCR zu untersuchen gelang aufgrund nicht gelöster methodischer Probleme nicht. Eine Ursache des stark differierenden Bandenmusters auch in der PCR könnte analog zum Western Blot der Nachweis von Isomeren, aber auch eine einfache Kontamination der Probe sein. Eine Optimierung könnte durch eine Veränderung im Primer-Design, einer höheren Annealing-Temperatur oder einer Verringerung der Primer-Konzentration erzielt werden. Dies sprengte jedoch den zeitlichen Rahmen der Arbeit und wurde daher nicht verfolgt.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 N-Cadherin

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikante Reduktion der Interaktion zwischen HTR-8/SVneo-Zellen und HUVEC-Tubuli in der 3D-Kokultur auf Matrigel® nach Expressionsunterdrückung von N-Cadherin ( $p = 0,006$ ). N-Cadherin

hat demnach für die Migration von HTR-8/SVneo-Zellen und der Interaktion von HTR-8/SVneo-Zellen mit HUVEC-Tubuli eine regulatorische Funktion.

Schon 1992 konnten Salomon et al. eine Expression von N-Cadherin auf HUVEC-Zellen feststellen. Sie vermuteten, dass N-Cadherin in Endothelzellen die Zellkontakte und -kommunikation mit anderen Zellen unterstützt (Salomon et al. 1992). Die membranständigen Cadherine regulieren das interzelluläre Wechselspiel von Zellen, indem sie eine Reihe zellulärer Prozesse wie die Organisation von Oberflächenrezeptoren, die Zytoskelettorganisation und die Verteilung von Makromolekülen und Proteinen beeinflussen (Yap et al. 2007). Eine Beteiligung an der Zellinteraktion von extravillösen Trophoblastzellen mit den Endothelzellen der Spiralarterien ist daher sehr plausibel, war jedoch bisher noch nicht weiter erforscht.

Mehr ist dagegen über die motilitätsfördernde Eigenschaft der N-Cadherin-Expression auf Zellen bekannt (Giampietro et al. 2012). In der Tumorgenese und Embryogenese wird N-Cadherin im Rahmen der epithelialen-mesenchymalen-Transition (EMT), welche Voraussetzung für eine Zellinvasivität ist, exprimiert (Yilmaz und Christofori 2009). Breier dokumentierte eine erhebliche Reduktion des Tumorwachstums von mesenchyalem Brustkrebs nach einer Unterdrückung der N-Cadherin Expression. Hier führte das fehlende N-Cadherin zu einer Reexpression von E-Cadherin an den Zell-Zell-Verbindungen (Breier et al. 2014). Eine Induktion von E-Cadherin bei Knockdown von N-Cadherin mittels siRNA-Transfektion konnten wir auf HTR-8/SVneo-Zellen allerdings nicht bestätigen. Bekräftigend beschreibt auch Nieman eine entkoppelte Expression von N- und E-Cadherin und stellte fest, dass N-Cadherin die Zellmotilität auch unabhängig der E-Cadherin-Expression fördere (Nieman et al. 1999).

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass N-Cadherin essentiell für die HTR-8/SVneo Motilität ist, wurde von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt: Ng et al. untersuchten die Steuerung von N-Cadherin über den regulatorischen Transkriptionsfaktor Twist und dessen Rolle bei der Trophoblastinvasion. Auch sie beobachteten, dass Twist und N-Cadherin zwar in extravillösen Trophoblastzellen, nicht aber in JEG-3 oder Bewo Zellen exprimiert werden. Durch siRNA Transfektion wurde Twist in HTR-8/SVneo-Zellen herabreguliert. Dies führte zu einer Verminderten N-Cadherin Expression und zu einer Reduktion der HTR-8/SVneo



Invasivität auf Matrigel. Die Autoren schließen ihre Untersuchungen mit der Hypothese ab, dass Twist ein voranstehender Regulator des N-Cadherin ist und dieses die Invasion von humanen Trophoblastzellen vermittelt (Ng et al. 2012). Peng et al. erkannten wiederum, dass eine Erhöhung von Gonadotropin-releasing hormon (GnRH) die Twist Expression stimuliert. Sie bestätigten die Regulation der N-Cadherinexpression über Twist auf HTR-8/SVneo Zellen und primären extravillösen Trophoblastzellen (Peng et al. 2015). Ein weiterer Modulator der N-Cadherin Expression wurde durch die Activine A, B und AB gefunden. Alle induzierten eine erhöhte N-Cadherin Expression und eine erhöhte Zellinvasion von HTR-8/SVneo Zellen auf Matrigel. Die Ergebnisse wurden mit primären extravillösen Trophoblastzellen verifiziert. Li Y et al. schlussfolgerten demnach dass Activin A, B und AB die Trophoblastinvasion über die Stimulation der Expression von N-Cadherin erhöhen (Li et al. 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass N-Cadherin eine entscheidende Funktion in der Trophoblastinvasion und Trophoblast-Endothel-Interaktion während der Plazentation erfüllt. Eine Expressionsanalyse von N-Cadherin in Plazentabettbiopsien von regelrechten Schwangerschaften im Vergleich zu Schwangerschaften mit Plazentationsstörungen könnte weiter Einblicke in die Verteilung von N-Cadherin ermöglichen.

### 5.2.2 CD162 und ihr Ligand P-Selektin

Bisher liegen kaum Ergebnisse über die Bedeutung von CD162 für die Plazentation vor. Bekannt ist für CD162, dass es den ersten Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen in frühen Stadien der Inflammation vermittelt (Taylor et al. 2000). CD162 bindet dabei an das, auf den Endothelzellen exprimierte, P-Selektin und vermittelt zusammen mit diesem das *homing* der Leukozyten zum Entzündungsfokus im Gewebe. Moore hatte 1998 zudem das Vorkommen von CD162-Antigen im Epithel des Eileiters festgestellt, was vermuten lässt dass es möglicherweise weitere Funktionen im Rahmen der Reproduktion erfüllt (Moore 1998).

P-Selektin ist der Ligand von CD162 und wird auf HUVEC-Zellen exprimiert wobei die Expression nach Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren (z.B.: Histamin, Thrombin) erheblich steigt (Wang et al. 2003, Mutin et al. 1997).

Außerdem konnten Burrows et al P-Selektin im Endothel der Decidua basalis nachweisen. Das Vorkommen im Gefäßbett der Spiralarterien deuten die Autoren als Ausdruck einer inflammatorischen Reaktion während der Schwangerschaft unter Beteiligung der Endothelien in den Spiralarterien (Burrows et al. 1993). Die Vermutung, dass P-Selektin die Bindung von Trophoblastzellen an das Endothel unterstützt konnte durch Beobachtungen von Thirkill und Douglas bekräftigt werden. Sie zeigten, dass eine Bindung von primär isolierten Cytotrophoblastzellen an das Endothel nach antikörpervermittelten Blockade von P-Selektin partiell gehemmt wird (Thirkill und Douglas 1999). Moore zeigte darüber hinaus, dass P-Selektin und CD162 innerhalb von Neutrophilen je nach Bedarf aktiv umverteilt werden. Eine Störung im Zytoskelet der Zelle würde demnach die Funktion dieser Moleküle stark einschränken (Moore 1998).

Unsere Ergebnisse deuten auf eine regulatorische Funktion von CD162 an der Interaktion von HTR-8/SVneo- und HUVEC-Zellen in einer 3D- Kokultur auf Matrigel hin. Die Minderung der Interaktion nach CD162- Knockdown war mit  $p = 0,27$  jedoch nicht statistisch signifikant. Zum Teil kann dies auf die beschriebenen methodischen Schwierigkeiten, wie die Inkonsistenzen in der Expression und Suppression von CD162 nach siRNA Transfektion, zurückgeführt werden. Vor diesem Hintergrund ist der eigentliche Einfluss von CD162 möglicherweise wesentlich größer als hier nachgewiesen werden konnte. Eine abschließende Beurteilung konnte deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen. Die weiterführende Forschung ist hier von entscheidender Bedeutung.

### 5.2.3 VCAM-1

Die Expression von VCAM-1 auf primären Endothelzellen der Dezidua und auf unterschiedlichen Endothelzelllinien gilt als belegt (Bulla et al. 2005). In immunhistologischen Untersuchungen von humanen Plazentaschnitten und -explantaten konnten Prakobphol et al. VCAM-1 ebenfalls auf Trophoblastzellen detektieren (Prakobphol et al. 2006). Die Expression scheint sich dabei im Rahmen der epithelialen-mesenchymalen-Transition der Trophoblastzellen zu steigern, sodass Zhou et al. VCAM-1 als selektiv für extravillöse Trophoblastzellen beschrieben (Zhou et al. 1997b, Harris 2011). Auf immortalisierten Trophoblastzelllinien ist



VCAM-1, wie in dieser Arbeit verifiziert, in HTR-8/SVneo-Zellen nachgewiesen wurden (Hu et al. 2010).

Sowohl im Mausmodell wie auch bei der Plazentation in Rindern soll VCAM-1 eine entscheidende Bedeutung haben (Fernekm et al. 2007). Bai et al. argumentieren, dass die VCAM-1 und VLA-4 Expression in Rindern eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Zell-Zell-Interaktion zwischen Frucht und Plazenta sei (Bai et al. 2014).

Die Bedeutung von VCAM-1 für die Plazentation im Menschen ist jedoch noch nicht geklärt. Zahlreiche Arbeitsgruppen erkannten, dass die VCAM-1 Expression in pathologischen Schwangerschaften verändert ist. Harris et al und Rajashekhar beobachteten unabhängig voneinander, dass die VCAM-1 Expression in extravillösen Trophoblastzellen von IUGR Plazenten herabgesetzt sei. (Harris 2010, Rajashekhar et al. 2003). Dasselbe ließe sich in Plazenten von Präeklampsie und von Frühgeburten nachweisen (Zhou et al. 1997a, Zygmunt et al. 1998, Xing et al. 2006). In spontanen Aborten sei die VCAM-1 Expression im Endothel des Abortmaterials ebenfalls vermindert (Yurdakan et al. 2008). Diese Publikationen postulieren eine bedeutende Rolle für VCAM-1 in der Trophoblast-Endothel-Interaktion und damit der regelrechten Plazentation.

Die Auswertung der Zellinteraktionsanalyse nach VCAM-1 Knockdown in HTR-8/SVneo-Zellen in dieser Arbeit ergab einen p-Wert von 0,53. VCAM-1 scheint daher, nach unseren Untersuchungen, weder für eine Verminderung noch eine Erhöhung der Trophoblast-Endothel-Interaktionen verantwortlich zu sein. Dieses Ergebnis war unerwartet, die möglichen Erklärungen sind vielfältig.

Durch Publikationen, welche eine Expression von VCAM-1 auf Trophoblast- und Endothelzellen bestritten entwickelte sich die Hypothese, dass die VCAM-1 Expression zunächst induziert werden muss (Dye et al. 2001). Hieraus eröffnete sich die Frage wodurch die VCAM-1 Expression sowohl in Trophoblast- wie auch in Endothelzellen stimuliert oder inhibiert werden könnte. Die induzierte Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen mittels inflammatorischen Zytokinen wie  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1 und LPS wurde vielfach beschrieben und auch in dieser Arbeit ließ sich ein eindeutiger und verlässlicher Nachweis von VCAM-1 auf HUVEC Zellen nur nach  $\text{TNF-}\alpha$  Stimulation erreichen (Osborn et al. 1992, Lechleitner et al. 1998). Ein

Einfluss von TNF- $\alpha$  oder VEGF auf die VCAM-1 Expression in den untersuchten Trophoblastzelllinien konnten wir nicht feststellen. Bulla et al behaupten, dass die Interaktion von Endothel- und Trophoblastzellen an sich zu einer verstärkten VCAM-1-Expression auf Endothelzellen führe (Bulla et al. 2005). CAO et al. konnten wiederum gar keine VCAM-1 Expression auf Proteinebene in Endothelzellen nach der Interaktion mit Trophoblastzellen, allerdings unter induziertem Scherstress, beobachten (Cao et al. 2008). Eine Absenkung der Oxygenierung führt dagegen zu einer signifikanten Minderung der VCAM-1-Expression in Plazenta-Explants und in *in vitro* kultivierten Trophoblastzellen (Rajashekhar et al. 2005). In diesem Zusammenhang kann diskutiert werden, dass die Inkubation von Zellen auf Matrigel mit einer relativen Hypoxie verbunden ist (Genbacev et al. 1996). Wäre die VCAM-1-Expression aufgrund dessen in den HTR-8/SVneo und HUVEC-Zellen primär bereits unterdrückt oder vermindert, könnte auch der erfolgreiche Knockdown des Moleküls keine weitere Interaktionsveränderung bewirken. Diese Theorie wird von Experimenten der eigenen Arbeitsgruppe bekräftigt, in denen nach Kokultivierung von HTR-8/SVneo und HUVEC- Zellen auf einem Matrigel® sich VCAM-1 weder in den Trophoblast noch in den Endothelzellen nachweisen ließ (Klas 2010). Eine weitere Erklärung für unser Forschungsergebnis kann die eingeschränkte Suppression von VCAM-1, mittels der siRNA Transfektion sein. Die Proteinexpressionsanalysen zeigten zwar eine Abnahme der VCAM-1 Expression, aber keine ausgeprägte Unterdrückung. Eine Unterbindung der VCAM-1 Produktion schließt nicht aus, dass VCAM-1 aus gespeicherten Zwischenprodukten zusammengesetzt und exprimiert werden kann. Darüber hinaus zeigen biochemische Analysen von Hahne et al., dass weitere kleine intrazelluläre Proteine existieren, welche ebenfalls von vielen VCAM-1 Antikörpern erkannt werden (Hahne et al. 1994). Ihre mögliche Funktion und ob sie sich zu VCAM-1 zusammenfügen können bleibt unklar.

Die Expressions- und Funktionsanalyse von VCAM-1 in der humanen Plazentation wird durch zahlreiche, zum Teil gegensätzliche Daten, kontrovers diskutiert. Während Cartwright eine signifikant geminderte Trophoblastbindung an Endothelzellen nach Blockierung der VCAM-1 und VLA-4 Moleküle auf der Endothelzelllinie SGHPL-4 mit Hilfe von Antikörpern festgestellt hatte, argumentieren andere Autoren, dass Stress und inflammatorische Zytokine die VCAM-1 Expression erhöhen und dies

wiederrum eine Ursache für Stress getriggerte Aborte sei (Prados et al. 2011, Cartwright und Balarajah 2005). Sie schlagen eine Blockierung von VCAM-1 vor um solche Aborte zu mindern.

Die potentielle Beteiligung von VCAM-1 während der humanen Plazentation *in vivo* ist bei weitem nicht ausreichend geklärt. Unsere Ergebnisse lassen keine abschließende Beurteilung der Bedeutung für die Trophoblast-Endothelzellinteraktion im Rahmen der Plazentation zu. Möglicherweise ist die unzureichende Aussagekraft der Arbeit an dieser Stelle dadurch erklärbar, dass das verwendete Model für diese Untersuchungen ungeeignet ist.

#### **5.2.4 Fetale oder maternale Dysregulation als Ursprung der IUGR?**

Die Forschung dieser Arbeit basiert auf der Hypothese, dass eine pathologisch reduzierte Invasionstiefe und eingeschränkte Interaktion von Trophoblast- und maternalen Endothelzellen während der Plazentation zu einer verminderten Funktion der Plazenta führen. Es sollten Adhäsionsmolekülpaare identifiziert werden, die an der Interaktion zwischen Trophoblastzellen und Endothelzellen im Rahmen der Plazentaentwicklung beteiligt sind. Grundsätzlich kann dabei eine gestörte Expression, sowohl auf den Trophoblastzellen als auch auf den Endothelzellen, eine mangelhafte Interaktion bewirken. In dieser Arbeit wurden allerdings alle Knockdown-Experimente an der extravillösen Trophoblastenzelllinie HTR-8/SVneo vorgenommen, während keine Manipulation an den HUVEC-Zellen, welche die Spiralarterien repräsentieren, erfolgte. Wir betrachten daher alleine die fetale Achse als Ursprung der Pathologie. Zahlreiche Studien der vergangenen Jahre haben allerdings gezeigt, dass Frauen mit IUGR oder Präeklampsie ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Herz-Kreislauferkrankungen im weiteren Lebensverlauf haben (Ahmed et al. 2014, Henriques et al. 2014, Melchiorre et al. 2012). Diese Daten weisen auf eine gestörte endotheliale Gesundheit der betroffenen Patientinnen hin. Übereinstimmend wird von einigen Autoren die Präeklampsie als Erkrankung des maternalen Endothels dargestellt (Powe et al. 2011, Staff et al. 2013). Der fehlende Nachweis einer signifikant gestörten Interaktion nach Hemmung der Expression von CD162 oder VCAM-1 in den Trophoblastzellen schließt deshalb die Bedeutung dieser Proteine für die spezifische Interaktion nicht aus. Eine Hemmung der Expression der



Interaktionspartner auf den Endothelzellen oder in beiden Zelllinien könnte hier die Bedeutung dieser Moleküle für die Interaktion dennoch bestätigen. Sollte sich eine gestörte Interaktion nach Expressionshemmung der Proteine auf den Endothelzellen ergeben würde dies die maternale (endotheliale) Komponente der Pathogenese der Erkrankung betonen. Führt dagegen nur die Veränderungen in der Expression der Adhäsionsmoleküle auf den Trophoblastzellen zu einer gestörten Interaktion kann trotz gesundem Endothel eine Plazentationsstörung entstehen.

Eine realistische Schlussfolgerung ist die Wechselwirkung von endothelialer und trophoblastärer Dysfunktion als Pathogenese der IUGR (Roberts und Hubel 2009).

### **5.2.5 Weitere Einflussfaktoren auf die Trophoblastinvasion**

Zahlreiche Forschungsgruppen beschäftigen sich mit der Pathogenese der Plazentainsuffizienz, wobei unterschiedliche Ansätze gewählt werden. Zusätzliche Einflussfaktoren auf die Trophoblastinvasion sollen hier deshalb kurz angesprochen werden.

Schon Kaufmann et al. beschrieben die Bedeutung der Sauerstoffsättigung für den Differenzierungsprozess und die Invasion von Trophoblastzellen (Kaufmann et al. 2003). Die frühen Stadien der Plazentaentwicklung verlaufen in einer relativen Hypoxie. Dieser Zustand fördert zum einen die Proliferation von villösen Trophoblastzellen, zum anderen initiiert die Hypoxie die epitheliale-mesotheliale-Transformation, welche in den auswandernden extravillösen Trophoblastzellen abläuft (Harris 2010). Die trophoblastäre Invasion an sich wird durch die anfängliche Hypoxie zunächst gehemmt (Onogi et al. 2011, Lash et al. 2006). Mit Anstieg des Sauerstoffgehalts nach Anschluss der maternalen Gefäße an den intervillösen Raum oder Eindringen der Trophoblastzellen in die maternalen Gefäße wird dann die Migration der Trophoblasten entgegen des Blutstromes gefördert (Huppertz et al. 2009). Entsprechend kann der Grad und der Zeitpunkt einer Hypoxie potentiell Mediator der veränderten Gefäßinvasion durch die Trophoblastzellen sein (Araki-Taguchi et al. 2008, Genbacev et al. 1997). Huppertz diskutiert weiter, dass die von ihm beobachteten, stark variierenden Apoptoseraten von extravillösen Trophoblastzellen in Plazentabettbiopsien (zwischen 4% und 50%) möglicherweise auf unterschiedliche Oxygenierungsgrade zurückzuführen seien (Huppertz et al. 2009). Zusammenfassend hat die Sauerstoffsättigung in der Umgebung der

Trophoblastzellen einen entscheidenden Einfluss auf ihre Zellzahl und Invasivität und kann somit eine Ursache der Plazentationsstörung sein.

Für das Verständnis der *in vivo* Gegebenheiten ist eine alleinige Analyse der Trophoblastverhalten nicht ausreichend. Es ist bekannt, dass umliegende Zellen wie Leukozyten, Makrophagen und uterine natürliche Killerzellen mit den wandernden Trophoblasten interagieren und dadurch die Expression der trophoblastären Adhäsionsmoleküle modulieren (Salamonsen et al. 2007, Tessier et al. 2015). Hannan et al. behaupten, dass erst durch diese Zellen die regelrechte Trophoblastmigration gewährleistet wird (Hannan und Salamonsen 2007). Eine Zunahme an uterinen natürlichen Killerzellen und Makrophagen soll als Quelle für Wachstumsfaktoren und Matrix abbauende Proteinasen dienen, die die extrazelluläre Matrix und die endothelialen Gefäße auf die invadierenden Trophoblastzellen vorbereiten (Harris 2011, Crocker et al. 2005). Durch Metalloproteinasen wird die Matrix zersetzt und die Zellinvasion ermöglicht (Bischof 1997). Etliche Arbeitsgruppen konnten *in vitro* zeigen, dass deziduale, natürliche Killerzellen durch Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen die HTR-8/SVneo Tubenformation, Invasion und Migration stimulieren können (Hu et al. 2006, Hu et al. 2010, King et al. 1996). Zu den einflussnehmenden Zytokinen gehören VEGF, Insulin like growth faktor, und PGE2 (Lacey et al. 2002, Horita et al. 2007, Nicola et al. 2008, Zhou et al. 2002). Zygmunt et al. zeigten beispielsweise, dass mit Inhibition von VEGF Rezeptor 2 die Migration von HTR-8/Svneo-Zellen und deren Interaktion mit HUVEC-Zellen deutlich vermindert wird (Zygmunt 2002). Die Erkenntnis, dass VEGF-R2 in Plazentabettbiopsien von Patientinnen mit Präeklampsie herabgesetzt ist, unterstützt diese Hypothese (Lindheimer und Romero 2007, Groten et al. 2010). Insulin-like growth factor -I und -II stimulieren die extravillöse Trophoblastproliferation und -migration (Crosley et al. 2014). Auch die Zytokine IL-1, IL-11, TGF- $\beta$ , EGF und LIF wurden als Einflussfaktoren auf die Migration von Trophoblastzellen ermittelt (Bischof 1997). Während Interleukin-11, TGF $\beta$  und MEL-CAM inhibierend auf die Migration und Invasion der extravillösen Trophoblastzellen wirken, stimulieren IGF-binding protein 1, Endothelin 1 und Bradykinin diese (Paiva et al. 2009, Erices et al. 2011).



Schwankende Glukosekonzentrationen in der trophoblastären Umgebung sollen das Verhalten von extravillösen Trophoblastzellen ebenfalls beeinflussen. Ein Anstieg der Glukosekonzentrationen resultierte in Forschungen von Belkacemi in einer signifikanten Inhibition der HTR-8/SVneo Invasivität (Belkacemi et al. 2005). Basak zeigte, dass dieser Effekt jedoch stark dosisabhängig ist: Glukose in normalen Konzentrationen induziert zunächst Tubenformation, Zellfunktion und -proliferation von HTR-8/SVneo-Zellen. Die Tubenstrukturen werden allerdings in der Anwesenheit von hohen Glukosespiegeln (40 mM) desintegriert (Basak et al. 2015). Eine pathologische Zunahme der Glukosekonzentration führt nicht nur zu einer signifikant verminderten Migration der Trophoblastzellen, sondern auch zu einem signifikanten Anstieg der Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und anti-angiogenen Faktoren wie sFlt-1 and sEndoglin (Han et al. 2015).

Hormone wurden ebenfalls als Einflussfaktoren identifiziert: Chen et al. diskutieren, dass  $\beta$ -hCG auf die HTR-8/SVneo Migration stimulierend wirken, während Progesteron die Migration und sogar die Zellzahl der Trophoblastzellen vermindern soll (Chen et al. 2011).

Die Liste an einflussnehmenden Faktoren auf die physiologische Plazentation wächst kontinuierlich an. Unsere Ergebnisse der Bedeutung der Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle in der Steuerung der Interaktion von Trophoblastzellen mit Endothelzellen haben zunächst davon unabhängig bestand. Viele der genannten Faktoren beeinflussen unabhängig von den genetischen Eigenschaften der Zellen die Adhäsionsmolekülexpression zusätzlich.

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die IUGR gehört in den industrialisierten Ländern durch die mit ihr verbundenen peripartalen und perinatalen Komplikationen zu den häufigsten geburtshilflichen Herausforderungen mit großer gesundheitsökonomischer Bedeutung (Duley 2009, Redman und Sargent 2005, Wilson et al. 2003). Aufgrund der immer noch stark lückenhaften Kenntnis über die Pathophysiologie bleibt das Verständnis der Ursache-Wirkungs-Beziehung der einzelnen plazentaren Veränderungen unklar und therapeutische Ansätze dadurch aus. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass N-Cadherin einen signifikanten Einfluss auf die Trophoblast-Endothelinteraktion *in vitro* hat und eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Plazentationsstörung spielen kann. Ebenso konnte nach Suppression der CD162-Expression eine deutlich verminderte Zellinteraktion festgestellt werden. Eine veränderte Trophoblast-Endothelinteraktion nach VCAM-1 Suppression konnte in unseren Experimenten nicht festgestellt werden. Zur Verifizierung der Ergebnisse ist es sinnvoll den beobachteten Effekt unter Verwendung von primären extravillösen Trophoblastzellen und Endothelzellen aus Spiralarterien zu untersuchen.

Es ist jedoch weitere Forschung notwendig, um die Signifikanz dieser Adhäsionsmoleküle für die Migration und Interaktion der extravillösen Trophoblastzellen mit den Endothelzellen, also dem *homing* in die Spiralarterien, *in vivo* zu bestätigen. Eine Möglichkeit hierfür ist ihre Quantifizierung in Plazentabettbiopsien von Patientinnen mit IUGR bei Plazentainsuffizienz im Vergleich zu gesunden Schwangeren mittels immunhistochemischer Färbung. Solche Untersuchungen sind aktuell geplant. Entsprechend unserer Hypothese vermuten wir, dass Frauen mit IUGR eine verminderte Expression von N-Cadherin und CD162/P-Selektin in den immunhistochemischen Untersuchungen aufweisen werden. Dabei kann die Expression sowohl in den extravillösen endothelialen Trophoblastzellen, als auch in den Endothelzellen selbst verändert sein.

Diese Forschungsarbeit liefert möglicherweise einen Ansatz für die Entwicklung von zukünftigen Screening- oder Therapiekonzepten, in denen die Expression der Adhäsionsmoleküle gesteigert werden könnte. Weiterführende Untersuchungen

könnten damit einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der Frauen- und Kindergesundheit liefern.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

#### Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau der humanen Plazenta .....	4
Abb. 2: Differenzierungsweg der plazentären Trophoblastzellen in verankerten Zotten .....	5
Abb. 3: Schematische Darstellung der gesunden und mangelhaften Trophoblastinvasion .....	6
Abb. 4: Interaktion verschiedener Trophoblastzelllinien mit Endothelzelltubuli in der 3D-Kokultur auf Matrigel® .....	11
Abb. 5: Schematischer Aufbau der untersuchten Adhäsionsmoleküle .....	13
Abb. 6: Methodenübersicht .....	23
Abb. 7: Auswertungsalgorithmus der Matrigel®-Aufnahmen .....	30
Abb. 8: Expression der selektierten Adhäsionsmoleküle in allen untersuchten Zelllinien .....	42
Abb. 9: cDNA Nachweis von ITGA-4, Untereinheit des VLA-4 Rezeptors .....	43
Abb. 10: VCAM-1-Expression nach Stimulation mit 5 ng/ml TNF- $\alpha$ oder 20 ng/ml VEGF .....	43
Abb. 11: Kontrolle des N-Cadherin-Knockdowns in HTR-8/SVneo-Zellen mittels Western-Blot .....	45
Abb. 12: Spezifitätsanalyse der N-Cadherin siRNA .....	46
Abb. 13: cDNA Nachweis von N-Cadherin nach Protein-Knockdown in HTR-8/SVneo-Zellen .....	47
Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse des N-Cadherin Knockdowns .....	48
Abb. 15: Western Blot Kontrolle des CD162 Knockdowns in HTR-8/SVneo-Zellen .....	49
Abb. 16: cDNA Nachweis von CD162 in den Zelllinien und nach Protein-Knockdown .....	50
Abb. 17: Western Blot Kontrolle des VCAM-1 Knockdowns in HTR-8/SVneo-Zellen .....	51
Abb. 18: Quantifizierung der Zellinteraktion verschiedener Trophoblastzelllinien mit Endothelzelltubuli in der 3D-Kokultur auf Matrigel® mittels <i>Wimasis Image Analysis</i> ® .....	53
Abb. 19: Auswertung der Interaktion verschiedener Trophoblastzelllinien mit Endothelzelltubuli in der 3D-Kokultur auf Matrigel® .....	54
Abb. 20: Qualitative Knockdownanalyse der selektierten Adhäsionsmoleküle in der 3D-Kokultur auf Matrigel® .....	55
Abb. 21: Wimasisauswertung der N-Cadherin Kokulturaufnahmen .....	56
Abb. 22: Wimasisauswertung der CD162 Kokulturaufnahmen .....	57
Abb. 23: Wimasisauswertung der VCAM-1 Kokulturaufnahmen .....	58



## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ergebnisse der mRNA-Analyse für die selektierten Adhäsionsmoleküle .....	12
Tab. 2: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Enzyme .....	18
Tab. 3: Verwendete Kits .....	20
Tab. 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	20
Tab. 5: Verwendete Geräte .....	21
Tab. 6: Methodenübersicht .....	23
Tab. 7: Verwendete Zelllinien und Medien .....	24
Tab. 8: Pipettierschema für den Knockdown der spezifischen Adhäsionsmoleküle bzw. deren Kontrollen .....	33
Tab. 9: siRNA-Konzentrationen für der Etablierung des CD162-Knockdowns .....	33
Tab. 10: Übersicht der verwendeten Antikörper für die Immunodetektion .....	36
Tab. 11: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	38
Tab. 12: Primer Sequenzen .....	39
Tab. 13: Zusammensetzung der Reagenzien für einen 10 µl PCR-Ansatz .....	39
Tab. 14: Temperaturprogramm für die PCR .....	39
Tab. 15: Zusammensetzungen der Lysepuffer .....	64

## 7.2 Rohdaten der quantitativen Matrigelanalyse mittels Wimasis®

### 7.2.1 N-Cadherin

Inkubationsmedien	Prozentsätze der roten Fluoreszenz ohne Kontakt zu der grünen Matrix	Mittelwerte (in Prozent)
Kontrolle	12, 28, 9, 22, 20, 14, 24, 15, 20, 7	17,1
no siRNA	12, 14, 7, 32, 11, 16, 28, 17, 26, 41	20,4
non target	28, 9, 11, 12, 16, 9, 28, 5, 7, 28	15,3
Knockdown	28, 15, 23, 17, 20, 15, 37, 35, 19, 7	21,6
Kontrolle	14, 10, 7, 8, 18, 13, 15, 10, 7, 7	10,9
no siRNA	11, 4, 3, 5, 17, 12, 8, 8, 21, 5	9,3
non target	15, 8, 5, 7, 4, 4, 15, 14, 8, 7	8,7
Knockdown	5, 14, 8, 5, 26, 27, 8, 7, 11, 5	11,6
Kontrolle	13, 16, 10, 17, 13, 11, 2, 9, 12, 11	11,4
no siRNA	3, 5, 9, 13, 10, 1, 4, 1, 9, 6	6,1
non target	10, 2, 9, 10, 1, 0, 2, 16, 9, 5	6,5
Knockdown	20, 8, 6, 17, 8, 4, 18, 10, 27, 22	14
Kontrolle	6, 10, 4, 4, 3, 3, 12, 11, 6, 4	6,3
no siRNA	5, 9, 3, 5, 1, 1, 14, 7, 6, 3	5,4
non target	1, 1, 1, 5, 2, 12, 4, 9, 7, 3	4,5
Knockdown	11, 15, 9, 24, 5, 6, 33, 5, 9, 5	12,2

Inkubationsmedien	Prozentsätze der roten Fluoreszenz ohne Kontakt zu der grünen Matrix	Mittelwerte (in Prozent)
non target	8, 2, 5, 18, 5, 5, 12, 2, 9, 5	7,1
Knockdown	24, 8, 19, 7, 9, 7, 6, 13, 6, 4	10,3

### 7.2.2 CD162

Inkubationsmedien	Prozentsätze der roten Fluoreszenz ohne Kontakt zu der grünen Matrix	Mittelwerte (in Prozent)
Kontrolle	5, 15, 12, 15, 21, 13, 21, 16, 17, 5	14
no siRNA	11, 7, 19, 14, 48, 20, 15, 19, 38, 28	21,9
non target	15, 25, 29, 29, 29, 21, 5, 27, 22, 5	20,7
Knockdown	26, 19, 38, 27, 32, 22, 14, 27, 23, 25	25,3
Kontrolle	22, 16, 17, 13, 11, 26, 28, 27, 28, 19	20,7
no siRNA	10, 25, 10, 9, 9, 13, 41, 27, 35, 26	20,5
non target	12, 11, 11, 11, 25, 10, 19, 18, 12, 14	14,3
Knockdown	26, 48, 35, 38, 32, 15, 17, 37, 30, 37	31,5
non target	15, 24, 6, 6, 6, 12, 5, 10, 19, 3	10,6
Knockdown	12, 6, 8, 6, 55, 5, 9, 2, 5, 6	11,4

### 7.2.3 VCAM-1

Inkubationsmedium	Prozentsätze der roten Fluoreszenz ohne Kontakt zu der grünen Matrix	Mittelwerte (in Prozent)
Kontrolle	13, 7, 35, 28, 30, 15, 23, 19, 22, 19	21,1
no siRNA	18, 11, 11, 31, 16, 41, 11, 13, 21, 10	18,3
non target	22, 12, 13, 38, 32, 12, 29, 16, 18, 20	21,2
Knockdown	20, 20, 13, 14, 12, 12, 4, 7, 37, 19	15,8
Kontrolle	37, 43, 44, 26, 12, 8, 37, 15, 25, 13	26
no siRNA	31, 16, 27, 24, 5, 10, 6, 31, 21, 31	20,2
non target	29, 14, 33, 6, 24, 22, 26, 29, 10, 44	23,7
Knockdown	44, 8, 34, 22, 11, 19, 25, 13, 22, 21	21,9
non target	3, 2, 4, 5, 4, 9, 11, 4, 3, 5	5
Knockdown	4, 18, 4, 10, 17, 9, 5, 5, 6, 10	8,8
non target	15, 24, 6, 6, 6, 12, 5, 10, 19, 3	10,6
Knockdown	12, 9, 5, 28, 3, 7, 4, 3, 10, 5	8,6

## 7.3 Literaturverzeichnis

- Aardema MW, Oosterhof H, Timmer A, van Rooy I, Aarnoudse JG. 2001. Uterine artery Doppler flow and uteroplacental vascular pathology in normal pregnancies and pregnancies complicated by pre-eclampsia and small for gestational age fetuses. *Placenta*, 22 (5):405-411.
- ACOG. 2009. ACOG Practice Bulletin No. 102: Management of stillbirth. *Obstet Gynecol*, 113 (3):748-761.
- ACOG. 2013. ACOG Practice bulletin no. 134: Fetal growth restriction. *Obstet Gynecol*, 121 (5):1122-1133.
- Ahmed R, Dunford J, Mehran R, Robson S, Kunadian V. 2014. Preeclampsia and Future Cardiovascular Risk among Women: A Review. *J Am Coll Cardiol*.
- Aldo PB, Krikun G, Visintin I, Lockwood C, Romero R, Mor G. 2007. A novel three-dimensional in vitro system to study trophoblast-endothelium cell interactions. *Am J Reprod Immunol*, 58 (2):98-110.
- Aplin JD. 1993. Expression of integrin alpha 6 beta 4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta*, 14 (2):203-215.
- Araki-Taguchi M, Nomura S, Ino K, Sumigama S, Yamamoto E, Kotani-Ito T, Hayakawa H, Kajiyama H, Shibata K, Itakura A, Kikkawa F. 2008. Angiotensin II mimics the hypoxic effect on regulating trophoblast proliferation and differentiation in human placental explant cultures. *Life Sci*, 82 (1-2):59-67.
- Bai R, Bai H, Kuse M, Ideta A, Aoyagi Y, Fujiwara H, Okuda K, Imakawa K, Sakurai T. 2014. Involvement of VCAM1 in the bovine conceptus adhesion to the uterine endometrium. *Reproduction*, 148 (2):119-127.
- Ball E, Bulmer JN, Ayis S, Lyall F, Robson SC. 2006. Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. *J Pathol*, 208 (4):535-542.
- Barker DJ. 2006. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol*, 49 (2):270-283.
- Basak S, Das MK, Srinivas V, Duttaroy AK. 2015. The interplay between glucose and fatty acids on tube formation and fatty acid uptake in the first trimester trophoblast cells, HTR8/SVneo. *Mol Cell Biochem*, 401 (1-2):11-19.
- Belkacemi L, Lash GE, Macdonald-Goodfellow SK, Caldwell JD, Graham CH. 2005. Inhibition of human trophoblast invasiveness by high glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*, 90 (8):4846-4851.
- Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinski J. 2014. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev*, 79-80:3-18.
- Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A, Golan A. 2000. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *Am J Obstet Gynecol*, 182 (1 Pt 1):198-206.
- Bilban M, Tauber S, Haslinger P, Pollheimer J, Saleh L, Pehamberger H, Wagner O, Knofler M. 2010. Trophoblast invasion: assessment of cellular models using gene expression signatures. *Placenta*, 31 (11):989-996.
- Bischof P. 1997. In vitro models used to study implantation, trophoblast invasion and placentation: A review. *Placenta*, 18, Supplement 2 (SN - 0143-4004).
- Blair E, Stanley F. 1990. Intrauterine growth and spastic cerebral palsy. I. Association with birth weight for gestational age. *Am J Obstet Gynecol*, 162 (1):229-237.
- Breier G, Grosser M, Rezaei M. 2014. Endothelial cadherins in cancer. *Cell Tissue Res*.



- Brosens I, Robertson WB, Dixon HG. 1967. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J Pathol Bacteriol*, 93 (2):569-579.
- Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA. 2002. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol*, 187 (5):1416-1423.
- Bulla R, Villa A, Bossi F, Casseti A, Radillo O, Spessotto P, De Seta F, Guaschino S, Tedesco F. 2005. VE-cadherin is a critical molecule for trophoblast-endothelial cell interaction in decidual spiral arteries. *Exp Cell Res*, 303 (1):101-113.
- Burrows TD, King A, Loke YW. 1993. Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin or fibronectin. *Hum Reprod*, 8 (3):475-484.
- Burrows TD, King A, Loke YW. 1994. Expression of adhesion molecules by endovascular trophoblast and decidual endothelial cells: implications for vascular invasion during implantation. *Placenta*, 15 (1):21-33.
- Burrows TD, King A, Loke YW. 1996. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update*, 2 (4):307-321.
- Cao TC, Thirkill TL, Wells M, Barakat AI, Douglas GC. 2008. Trophoblasts and shear stress induce an asymmetric distribution of icam-1 in uterine endothelial cells. *Am J Reprod Immunol*, 59 (2):167-181.
- Carter AM. 2007. Animal models of human placentation—a review. *Placenta*, 28 Suppl A:S41-47.
- Cartwright JE, Balarajah G. 2005. Trophoblast interactions with endothelial cells are increased by interleukin-1 $\beta$  and tumour necrosis factor  $\alpha$  and involve vascular cell adhesion molecule-1 and  $\alpha$ 4 $\beta$ 1. *Exp Cell Res*, 304 (1):328-336.
- Cartwright JE, Fraser R, Leslie K, Wallace AE, James JL. 2010. Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction*, 140 (6):803-813.
- Cetin I, Antonazzo P. 2009. The role of the placenta in intrauterine growth restriction (IUGR). *Z Geburtshilfe Neonatol*, 213 (3):84-88.
- Cetin I, Alvino G. 2009. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport. A review. *Placenta*, 30 Suppl A:S77-82.
- Chen JZ, Wong MH, Brennecke SP, Keogh RJ. 2011. The effects of human chorionic gonadotrophin, progesterone and oestradiol on trophoblast function. *Mol Cell Endocrinol*, 342 (1-2):73-80.
- Crocker IP, Wareing M, Ferris GR, Jones CJ, Cartwright JE, Baker PN, Aplin JD. 2005. The effect of vascular origin, oxygen, and tumour necrosis factor  $\alpha$  on trophoblast invasion of maternal arteries in vitro. *J Pathol*, 206 (4):476-485.
- Crosley EJ, Dunk CE, Beristain AG, Christians JK. 2014. IGFBP-4 and -5 are expressed in first-trimester villi and differentially regulate the migration of HTR-8/SVneo cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 12:123.
- Damsky CH, Fisher SJ. 1998. Trophoblast pseudo-vasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 10 (5):660-666.
- Davis GE, Senger DR. 2005. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res*, 97 (11):1093-1107.
- De Wolf F, De Wolf-Peeters C, Brosens I, Robertson WB. 1980. The human placental bed: electron microscopic study of trophoblastic invasion of spiral arteries. *Am J Obstet Gynecol*, 137 (1):58-70.



- Duley L. 2009. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*, 33 (3):130-137.
- Dye JF, Jablenska R, Donnelly JL, Lawrence L, Leach L, Clark P, Firth JA. 2001. Phenotype of the endothelium in the human term placenta. *Placenta*, 22 (1):32-43.
- Erices R, Corthorn J, Lisboa F, Valdes G. 2011. Bradykinin promotes migration and invasion of human immortalized trophoblasts. *Reprod Biol Endocrinol*, 9:97.
- Fernekmann U, Butcher EC, Behrends J, Karsten CM, Robke A, Schulze TJ, Kirchner H, Kruse A. 2007. Selectin, platelet plays a critical role in granulocyte access to the pregnant mouse uterus under physiological and pathological conditions. *Biol Reprod*, 76 (4):645-653.
- Floridon C, Nielsen O, Holund B, Sunde L, Westergaard JG, Thomsen SG, Teisner B. 2000. Localization of E-cadherin in villous, extravillous and vascular trophoblasts during intrauterine, ectopic and molar pregnancy. *Mol Hum Reprod*, 6 (10):943-950.
- Frenette PS, Wagner DD. 1996. Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med*, 334 (23):1526-1529.
- Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. 1997. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*, 277 (5332):1669-1672.
- Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ. 1996. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest*, 97 (2):540-550.
- Gerretsen G, Huisjes HJ, Elema JD. 1981. Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol*, 88 (9):876-881.
- Gheldof A, Berx G. 2013. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 116:317-336.
- Giampietro C, Taddei A, Corada M, Sarra-Ferraris GM, Alcalay M, Cavallaro U, Orsenigo F, Lampugnani MG, Dejana E. 2012. Overlapping and divergent signaling pathways of N-cadherin and VE-cadherin in endothelial cells. *Blood*, 119 (9):2159-2170.
- Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK. 1993. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res*, 206 (2):204-211.
- Groten T, Gebhard N, Kreienberg R, Schleussner E, Reister F, Huppertz B. 2010. Differential expression of VE-cadherin and VEGFR2 in placental syncytiotrophoblast during preeclampsia - New perspectives to explain the pathophysiology. *Placenta*, 31 (4):339-343.
- Hafner E, Metzenbauer M, Höfinger D, Munkel M, Gassner R, Schuchter K, Dillinger-Paller B, Philipp K. 2002. Das Wachstum der Plazenta im ersten und zweiten Trimenon bei SGA-Feten und Präeklampsie-Schwangerschaften. In: Schleussner E, Seewald H-J, Hrsg. Plazenta- Physiologie und Klinik 4 Jenaer Geburtshilfe-Symposium. Aachen: Shaker Verlag, pp 106-113.
- Hahne M, Lenter M, Jäger U, Vestweber D. 1994. A novel soluble form of mouse VCAM-1 is generated from a glycolipid-anchored splicing variant. *Eur J Immunol*, 24 (2):421-428.
- Hallan S, Euser AM, Irgens LM, Finken MJ, Holmen J, Dekker FW. 2008. Effect of intrauterine growth restriction on kidney function at young adult age: the Nord Trøndelag Health (HUNT 2) Study. *Am J Kidney Dis*, 51 (1):10-20.

- Han CS, Herrin MA, Pitruzzello MC, Mulla MJ, Werner EF, Pettker CM, Flannery CA, Abrahams VM. 2015. Glucose and metformin modulate human first trimester trophoblast function: a model and potential therapy for diabetes-associated uteroplacental insufficiency. *Am J Reprod Immunol*, 73 (4):362-371.
- Hannan NJ, Salamonsen LA. 2007. Role of chemokines in the endometrium and in embryo implantation. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 19 (3):266-272.
- Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA. 2010. Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biol Reprod*, 82 (2):235-245.
- Harris LK. 2010. Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta*, 31 Suppl:S93-98.
- Harris LK. 2011. IFPA Gabor Than Award lecture: Transformation of the spiral arteries in human pregnancy: key events in the remodelling timeline. *Placenta*, 32 Suppl 2:S154-158.
- Harris LK, Jones CJ, Aplin JD. 2009. Adhesion molecules in human trophoblast - a review. II. extravillous trophoblast. *Placenta*, 30 (4):299-304.
- Helige C, Ahammer H, Hammer A, Huppertz B, Frank HG, Dohr G. 2008. Trophoblastic invasion in vitro and in vivo: similarities and differences. *Hum Reprod*, 23 (10):2282-2291.
- Henriques AC, Carvalho FH, Feitosa HN, Macena RH, Mota RM, Alencar JC. 2014. Endothelial dysfunction after pregnancy-induced hypertension. *Int J Gynaecol Obstet*, 124 (3):230-234.
- Hight AR, Zhang VJ, Heinemann GK, Roberts CT. 2012. Use of Matrigel in culture affects cell phenotype and gene expression in the first trimester trophoblast cell line HTR8/SVneo. *Placenta*, 33 (7):586-588.
- Horita H, Kuroda E, Hachisuga T, Kashimura M, Yamashita U. 2007. Induction of prostaglandin E2 production by leukemia inhibitory factor promotes migration of first trimester extravillous trophoblast cell line, HTR-8/SVneo. *Hum Reprod*, 22 (7):1801-1809.
- Hu Y, Dutz JP, MacCalman CD, Yong P, Tan R, von Dadelszen P. 2006. Decidual NK cells alter in vitro first trimester extravillous cytotrophoblast migration: a role for IFN-gamma. *J Immunol*, 177 (12):8522-8530.
- Hu Y, Eastabrook G, Tan R, MacCalman CD, Dutz JP, von Dadelszen P. 2010. Decidual NK cell-derived conditioned medium enhances capillary tube and network organization in an extravillous cytotrophoblast cell line. *Placenta*, 31 (3):213-221.
- Hubert Rehm TL. 2010. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics*. 6. Auflage Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Huppertz B, Peeters LL. 2005. Vascular biology in implantation and placentation. *Angiogenesis*, 8 (2):157-167.
- Huppertz B, Gauster M, Orendi K, König J, Moser G. 2009. Oxygen as modulator of trophoblast invasion. *J Anat*, 215 (1):14-20.
- Huxley RR, Shiell AW, Law CM. 2000. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J Hypertens*, 18 (7):815-831.
- Jaffe R, Woods JR, Jr. 1993. Color Doppler imaging and in vivo assessment of the anatomy and physiology of the early uteroplacental circulation. *Fertil Steril*, 60 (2):293-297.



- James JL, Carter AM, Chamley LW. 2012. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? *Placenta*, 33 (5):327-334.
- Johnsen GM, Basak S, Weedon-Fekjaer MS, Staff AC, Duttaroy AK. 2011. Docosahexaenoic acid stimulates tube formation in first trimester trophoblast cells, HTR8/SVneo. *Placenta*, 32 (9):626-632.
- Kaijser M, Bonamy AK, Akre O, Cnattingius S, Granath F, Norman M, Ekbom A. 2008. Perinatal risk factors for ischemic heart disease: disentangling the roles of birth weight and preterm birth. *Circulation*, 117 (3):405-410.
- Kanaka-Gantenbein C, Mastorakos G, Chrousos GP. 2003. Endocrine-related causes and consequences of intrauterine growth retardation. *Ann N Y Acad Sci*, 997:150-157.
- Kaspi E, Guillet B, Piercecchi-Marti MD, Alfaidy N, Bretelle F, Bertaud-Foucault A, Stalin J, Rambelison L, Lacroix O, Blot-Chabaud M, Dignat-George F, Bardin N. 2013. Identification of soluble CD146 as a regulator of trophoblast migration: potential role in placental vascular development. *Angiogenesis*, 16 (2):329-342.
- Kaufmann P, Black S, Huppertz B. 2003. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*, 69 (1):1-7.
- Kaufmann P HB, Frank H.-G. 2002. Remodelling der plazentaren Kreislaufsysteme als Anpassung von Struktur und Funktion. In: Schleussner E, Seewald, H.-J., Hrsg. *Plazenta-Physiologie und Klinik- 4 Jenaer Geburtshilfe-Symposium*. Aachen: Shaker-Verlag, pp. 4-21.
- Khankin EV, Royle C, Karumanchi SA. 2010. Placental vasculature in health and disease. *Semin Thromb Hemost*, 36 (3):309-320.
- Kim YM, Bujold E, Chaiworapongsa T, Gomez R, Yoon BH, Thaler HT, Rotmensch S, Romero R. 2003. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 189 (4):1063-1069.
- King A, Jokhi PP, Burrows TD, Gardner L, Sharkey AM, Loke YW. 1996. Functions of human decidual NK cells. *Am J Reprod Immunol*, 35 (3):258-260.
- Klas M. 2010. Untersuchung ausgewählter Adhäsionsmoleküle und deren Bedeutung für die Interaktion von Endothelzelltubuli und Trophoblastzellen im Kokulturmodell Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Kokkinos MI, Murthi P, Wafai R, Thompson EW, Newgreen DF. 2010. Cadherins in the human placenta—epithelial-mesenchymal transition (EMT) and placental development. *Placenta*, 31 (9):747-755.
- Lacey H, Haigh T, Westwood M, Aplin JD. 2002. Mesenchymally-derived insulin-like growth factor 1 provides a paracrine stimulus for trophoblast migration. *BMC Dev Biol*, 2:5.
- Lackman F, Capewell V, Richardson B, daSilva O, Gagnon R. 2001. The risks of spontaneous preterm delivery and perinatal mortality in relation to size at birth according to fetal versus neonatal growth standards. *Am J Obstet Gynecol*, 184 (5):946-953.
- LaMarca HL, Ott CM, Honer Zu Bentrup K, Leblanc CL, Pierson DL, Nelson AB, Scandurro AB, Whitley GS, Nickerson CA, Morris CA. 2005. Three-dimensional growth of extravillous cytotrophoblasts promotes differentiation and invasion. *Placenta*, 26 (10):709-720.

- Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, Robson SC. 2006. Low oxygen concentrations inhibit trophoblast cell invasion from early gestation placental explants via alterations in levels of the urokinase plasminogen activator system. *Biol Reprod*, 74 (2):403-409.
- Lechleitner S, Gille J, Johnson DR, Petzelbauer P. 1998. Interferon enhances tumor necrosis factor-induced vascular cell adhesion molecule 1 (CD106) expression in human endothelial cells by an interferon-related factor 1-dependent pathway. *J Exp Med*, 187 (12):2023-2030.
- Li Y, Klausen C, Cheng JC, Zhu H, Leung PC. 2014. Activin A, B, and AB increase human trophoblast cell invasion by up-regulating N-cadherin. *J Clin Endocrinol Metab*, 99 (11):E2216-2225.
- Lian IA, Toft JH, Olsen GD, Langaas M, Bjorge L, Eide IP, Bordahl PE, Austgulen R. 2010. Matrix metalloproteinase 1 in pre-eclampsia and fetal growth restriction: reduced gene expression in decidual tissue and protein expression in extravillous trophoblasts. *Placenta*, 31 (7):615-620.
- Lin JY, Simmons DT. 1991. The ability of large T antigen to complex with p53 is necessary for the increased life span and partial transformation of human cells by simian virus 40. *J Virol*, 65 (12):6447-6453.
- Lindheimer MD, Romero R. 2007. Emerging roles of antiangiogenic and angiogenic proteins in pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*, 50 (1):35-36.
- Liu S, Li Q, Na Q, Liu C. 2012. Endothelin-1 stimulates human trophoblast cell migration through Cdc42 activation. *Placenta*, 33 (9):712-716.
- Madazli R, Somunkiran A, Calay Z, Ilvan S, Aksu MF. 2003. Histomorphology of the placenta and the placental bed of growth restricted fetuses and correlation with the Doppler velocimetry of the uterine and umbilical arteries. *Placenta*, 24 (5):510-516.
- Maitre JL, Heisenberg CP. 2013. Three functions of cadherins in cell adhesion. *Curr Biol*, 23 (14):R626-633.
- Mardon H, Grewal S, Mills K. 2007. Experimental models for investigating implantation of the human embryo. *Semin Reprod Med*, 25 (6):410-417.
- Meegdes BH, Ingenhoves R, Peeters LL, Exalto N. 1988. Early pregnancy wastage: relationship between chorionic vascularization and embryonic development. *Fertil Steril*, 49 (2):216-220.
- Melchiorre K, Sutherland GR, Liberati M, Thilaganathan B. 2012. Maternal cardiovascular impairment in pregnancies complicated by severe fetal growth restriction. *Hypertension*, 60 (2):437-443.
- Metzenbauer M, Hafner E, Hoefinger D, Schuchter K, Philipp K. 2002. [Associations between birth weight and placental volume in the first trimester]. *Z Geburtshilfe Neonatol*, 206 (4):138-141.
- Molina-Jimenez F, Benedicto I, Dao Thi VL, Gondar V, Lavillette D, Marin JJ, Briz O, Moreno-Otero R, Aldabe R, Baumert TF, Cosset FL, Lopez-Cabrera M, Majano PL. 2012. Matrigel-embedded 3D culture of Huh-7 cells as a hepatocyte-like polarized system to study hepatitis C virus cycle. *Virology*, 425 (1):31-39.
- Moore KL. 1998. Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk Lymphoma*, 29 (1-2):1-15.
- Morrish DW, Whitley GS, Cartwright JE, Graham CH, Caniggia I. 2002. In vitro models to study trophoblast function and dysfunction-- a workshop report. *Placenta*, 23 Suppl A:S114-118.



- Mutin M, Dignat-George F, Sampol J. 1997. Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. *Tissue Antigens*, 50 (5):449-458.
- Nakajima S, Doi R, Toyoda E, Tsuji S, Wada M, Koizumi M, Tulachan SS, Ito D, Kami K, Mori T, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Hosotani R, Imamura M. 2004. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10 (12 Pt 1):4125-4133.
- Nanaev A, Chwalisz K, Frank HG, Kohnen G, Hegele-Hartung C, Kaufmann P. 1995. Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of extravillous trophoblast. *Cell Tissue Res*, 282 (3):407-421.
- Ng YH, Zhu H, Leung PC. 2012. Twist modulates human trophoblastic cell invasion via regulation of N-cadherin. *Endocrinology*, 153 (2):925-936.
- Nicola C, Lala PK, Chakraborty C. 2008. Prostaglandin E2-mediated migration of human trophoblast requires RAC1 and CDC42. *Biol Reprod*, 78 (6):976-982.
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. 1999. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol*, 147 (3):631-644.
- Oefner CM, Sharkey A, Gardner L, Critchley H, Oyen M, Moffett A. 2015. Collagen type IV at the fetal-maternal interface. *Placenta*, 36 (1):59-68.
- Onogi A, Naruse K, Sado T, Tsunemi T, Shigetomi H, Noguchi T, Yamada Y, Akasaki M, Oi H, Kobayashi H. 2011. Hypoxia inhibits invasion of extravillous trophoblast cells through reduction of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation in the early first trimester of human pregnancy. *Placenta*, 32 (9):665-670.
- Osborn L, Vassallo C, Benjamin CD. 1992. Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *J Exp Med*, 176 (1):99-107.
- Paiva P, Salamonsen LA, Manuelpillai U, Dimitriadis E. 2009. Interleukin 11 inhibits human trophoblast invasion indicating a likely role in the decidual restraint of trophoblast invasion during placentation. *Biol Reprod*, 80 (2):302-310.
- Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (10):839-845.
- Peng B, Zhu H, Leung PC. 2015. Gonadotropin-releasing hormone regulates human trophoblastic cell invasion via TWIST-induced N-cadherin expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 100 (1):E19-29.
- Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. 2006. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta*, 27 (9-10):939-958.
- Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I. 1980. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta*, 1 (1):3-19.
- Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. 2011. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*, 123 (24):2856-2869.
- Prados MB, Solano ME, Friebe A, Blois S, Arck P, Miranda S. 2011. Stress increases VCAM-1 expression at the fetomaternal interface in an abortion-prone mouse model. *J Reprod Immunol*, 89 (2):207-211.
- Prakobphol A, Genbacev O, Gormley M, Kapidzic M, Fisher SJ. 2006. A role for the L-selectin adhesion system in mediating cytotrophoblast emigration from the placenta. *Dev Biol*, 298 (1):107-117.

- Rajashekhar G, Loganath A, Roy AC, Wong YC. 2003. Expression and secretion of the vascular cell adhesion molecule-1 in human placenta and its decrease in fetal growth restriction. *J Soc Gynecol Investig*, 10 (6):352-360.
- Rajashekhar G, Loganath A, Roy AC, Chong SS, Wong YC. 2005. Hypoxia up-regulated angiogenin and down-regulated vascular cell adhesion molecule-1 expression and secretion in human placental trophoblasts. *J Soc Gynecol Investig*, 12 (5):310-319.
- Redman CW, Sargent IL. 2005. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, 308 (5728):1592-1594.
- Roberts JM, Hubel CA. 2009. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta*, 30 Suppl A:S32-37.
- Robertson WB. 1976. Uteroplacental vasculature. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*, 10:9-17.
- Rosenberg A. 2008. The IUGR newborn. *Semin Perinatol*, 32 (3):219-224.
- Sadler T. 2008. *Medizinische Embryologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Salamonsen LA, Hannan NJ, Dimitriadis E. 2007. Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation. *Semin Reprod Med*, 25 (6):437-444.
- Salomon D, Ayalon O, Patel-King R, Hynes RO, Geiger B. 1992. Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells. *J Cell Sci*, 102 (Pt 1):7-17.
- Scherberich A, Beretz A. 2000. Culture of vascular cells in tridimensional (3-D) collagen: a methodological review. *Therapie*, 55 (1):35-41.
- Schneider H. RL, Dürig P. 2002. Bedeutung von Störungen der Implantation und der frühen Plazentaentwicklung für die Entstehung der Präeklampsie. In: Schleussner E, Seewald, H.-J., Hrsg. *Plazenta- Physiologie und Klinik*, 4 Jenaer Geburtshilfe-Symposium. Aachen: Shaker-Verlag, pp. 72-81.
- Shih Ie M, Hsu MY, Oldt RJ, 3rd, Herlyn M, Gearhart JD, Kurman RJ. 2002. The Role of E-cadherin in the Motility and Invasion of Implantation Site Intermediate Trophoblast. *Placenta*, 23 (10):706-715.
- Shiverick KT, King A, Frank H, Whitley GS, Cartwright JE, Schneider H. 2001. Cell culture models of human trophoblast II: trophoblast cell lines--a workshop report. *Placenta*, 22 Suppl A:S104-106.
- Sibley CP, Turner MA, Cetin I, Ayuk P, Boyd CA, D'Souza SW, Glazier JD, Greenwood SL, Jansson T, Powell T. 2005. Placental phenotypes of intrauterine growth. *Pediatr Res*, 58 (5):827-832.
- Slota JE, Braun OO, Menger MD, Thorlacius H. 2009. Capture of platelets to the endothelium of the femoral vein is mediated by CD62P and CD162. *Platelets*, 20 (7):505-512.
- Song J, Rolfe BE, Hayward IP, Campbell GR, Campbell JH. 2000. Effects of collagen gel configuration on behavior of vascular smooth muscle cells in vitro: association with vascular morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 36 (9):600-610.
- Stachowiak H. 1973. *Allgemeine Modelltheorie* 131-133.
- Staff AC, Dechend R, Redman CW. 2013. Review: Preeclampsia, acute atherosclerosis of the spiral arteries and future cardiovascular disease: two new hypotheses. *Placenta*, 34 Suppl:S73-78.
- Stevenson DK, Wright LL, Lemons JA, Oh W, Korones SB, Papile LA, Bauer CR, Stoll BJ, Tyson JE, Shankaran S, Fanaroff AA, Donovan EF, Ehrenkranz RA, Verter J. 1998. Very low birth weight outcomes of the National Institute of



- Child Health and Human Development Neonatal Research Network. January 1993 through December 1994. *Am J Obstet Gynecol*, 179 (6 Pt 1):1632-1639.
- Suman P, Gupta SK. 2012. Comparative analysis of the invasion-associated genes expression pattern in first trimester trophoblastic (HTR-8/SVneo) and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Placenta*, 33 (10):874-877.
- Taylor ML, Brummet ME, Hudson SA, Miura K, Bochner BS. 2000. Expression and function of P-selectin glycoprotein ligand 1 (CD162) on human basophils. *J Allergy Clin Immunol*, 106 (5):918-924.
- Tessier DR, Yockell-Lelievre J, Gruslin A. 2015. Uterine Spiral Artery Remodeling: The Role of Uterine Natural Killer Cells and Extravillous Trophoblasts in Normal and High-Risk Human Pregnancies. *Am J Reprod Immunol*, 74 (1):1-11.
- Thirkill TL, Douglas GC. 1999. The vitronectin receptor plays a role in the adhesion of human cytotrophoblast cells to endothelial cells. *Endothelium*, 6 (4):277-290.
- Uemura M, Refaat MM, Shinoyama M, Hayashi H, Hashimoto N, Takahashi J. 2010. Matrigel supports survival and neuronal differentiation of grafted embryonic stem cell-derived neural precursor cells. *J Neurosci Res*, 88 (3):542-551.
- van Buul JD, Hordijk PL. 2009. Endothelial adapter proteins in leukocyte transmigration. *Thromb Haemost*, 101 (4):649-655.
- Wang Y, Liu Q, Thorlacius H. 2003. Docosahexaenoic acid inhibits cytokine-induced expression of P-selectin and neutrophil adhesion to endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, 459 (2-3):269-273.
- Whincup PH, Kaye SJ, Owen CG, Huxley R, Cook DG, Anazawa S, Barrett-Connor E, Bhargava SK, Birgisdottir BE, Carlsson S, de Rooij SR, Dyck RF, Eriksson JG, Falkner B, Fall C, Forsen T, Grill V, Gudnason V, Hulman S, Hypponen E, Jeffreys M, Lawlor DA, Leon DA, Minami J, Mishra G, Osmond C, Power C, Rich-Edwards JW, Roseboom TJ, Sachdev HS, Syddall H, Thorsdottir I, Vanhala M, Wadsworth M, Yarbrough DE. 2008. Birth weight and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *JAMA*, 300 (24):2886-2897.
- Wilson ML, Goodwin TM, Pan VL, Ingles SA. 2003. Molecular epidemiology of preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*, 58 (1):39-66.
- Xing AY, Liu SY, You Y, Yang KX. 2006. [VCAM-1 and E-selectin expression in extravillous cytotrophoblasts of severe preeclampsia]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 37 (3):408-411.
- Yap AS, Crampton MS, Hardin J. 2007. Making and breaking contacts: the cellular biology of cadherin regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 19 (5):508-514.
- Yilmaz M, Christofori G. 2009. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 28 (1-2):15-33.
- Yurdakan G, Ekem TE, Bahadır B, Gun BD, Kuzey GM, Ozdamar SO. 2008. Expression of adhesion molecules in first trimester spontaneous abortions and their role in abortion pathogenesis. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 87 (7):775-782.
- Zhang Q, Tan D, Luo W, Lu J, Tan Y. 2012. Expression of CD82 in human trophoblast and its role in trophoblast invasion. *PLoS One*, 7 (6):e38487.
- Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. 1997a. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest*, 99 (9):2152-2164.

- Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. 1997b. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest*, 99 (9):2139-2151.
- Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ. 2002. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol*, 160 (4):1405-1423.
- Zygmunt M. 2002. Entwicklung der Gefäßversorgung in der fetomaternalen Einheit-eine kurze Übersicht. In: Schleussner E, Seewald, H-J., Hrsg. Plazenta-Physiologie und Klinik 4 Jenaer Geburtshilfe Symposium. Aachen: Shaker Verlag, pp26-38.
- Zygmunt M, Wienhard J, Boving B, Munstedt K, Braems G, Bohle RM, Lang U. 1998. [Expression of cell adhesion molecules in the extravillous trophoblast in placentas of preterm pregnancies and in placentas at term]. *Zentralbl Gynakol*, 120 (10):488-492.



## 7.4 Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name	Anna Katharina Multhaup (geb. Weichold)
Geburtsdatum	14. März 1988
Geburtsort:	Friedrichroda, Thüringen
Adresse	Im Kleinen Dorf 13a, 076464 Laasdorf
E-mail-Adresse	anna.multhaup@med.uni-jena.de

### Schulbildung

1994 – 1996	Wyngate Elementary School, Bethesda MD, USA
1996 - 2007	Deutsche Schule Washington D.C., Potomac MD, USA
06/2006	US High School Diploma, Deutsche Schule Washington D.C.
06/2007	Abitur, Deutsche Schule Washington D.C., Note: 1,3

### Studium

10/2007-11/2014	Medizinstudium, Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2009	1. Staatsexamen, Note: 3,0
11/2014	2. Staatsexamen, Note: 3,0
12/2014	Approbation

### Berufserfahrung

seit 05/2015	Assistenzärztin, Geburtshilfe, Universitätsfrauenklinik Jena
--------------	--

## 7.5 Danksagung

Von ganzem Herzen danke ich PD Dr. med. Tanja Groten für die Vergabe dieses spannenden Forschungsthemas, die enge Zusammenarbeit, die weitreichende Inspiration und die entstandene Freundschaft.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Udo R. Markert für die Ermöglichung der Durchführung meiner Promotion in seinem Labor und die kontinuierliche Förderung. Auch dem gesamten Plazentalaborteam danke ich für die anregenden und aufbauenden Diskussionen, Unterstützung bei alltäglichen Herausforderungen und der Beantwortung meiner zahlreichen Fragen sowie der Freundschaften die sich hier entwickelten. Besonderer Dank gilt hier Sebastian Hölters, Claudia Göhner und Jana Pastuscheck für die hervorragende Einarbeitung einer laborunerfahrenen Studentin. Michael Böhringer danke ich für seinen Rat und seine Hilfestellung. Prof. Schleußner möchte ich für sein Vertrauen und der Ermöglichung meiner klinischen Ausbildung in der Geburtshilfe der Universitätsklinik besonderen Dank aussprechen.

Ich bedanke mich beim IZKF für das halbjährliche Forschungsstipendium.

Prof. Dr. med. Kurzai danke ich für die Bereitstellung des Epifluoreszenzmikroskopes *AxioObserver Z1* der Firma Zeiss am HKI.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden hier in Jena für ein zuhause weg von zuhause und meiner Familie für die kontinuierliche Unterstützung meiner Entscheidungen und persönlichen Entwicklung. Raul, dir danke ich vor allem für die Kraft und die Liebe, welche du mir täglich gibst und das gemeinsame Lachen, welches mir immer wieder die richtige Lebensperspektive zeigt. Dank gilt auch meinem Sohn, der mir einen Sinn und eine Motivation im Leben gibt, welche durch nichts anderes ersetzt werden kann.

## 7.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med Tanja Groten bei der Konzeption, Ausführung und Analyse der Experimente, sowie der Formulierung dieses Manuskripts, Dipl. Biol. Jana Pastuschek M.sc. bei der Genanalyse mittels PCR, sowie Dr. Lehnmann bei der statistischen Analyse der erworbenen Daten,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 22.02.2016

Anna Multhaup